

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Lilian Leetsi

**Inimese WBSCR22 valgu aktiivsus pagaripärmis *Saccharomyces
cerevisiae***

Magistritöö

Juhendajad *Ph D* Reet Kurg
M Sc Kadri Õunap

TARTU 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 7q11.23 piirkonna ümberkorraldused	6
1.2 Williams-Beureni sündroom	8
1.3 WBSCR22 valk	9
1.4 Bud23 on WBSCR22 homoloog pärmis	12
1.5 Ribosoomide biogenees.....	14
1.5.1 pre-40S rRNA moodustumine.....	16
1.6 Tuumake on funktsionaalne kompartment	19
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1 Eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja meetodika.....	22
2.2.1 Plasmiidid.....	22
2.2.2 Eukariootsed rakud.....	24
2.2.3 Eukariootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel.....	24
2.2.4 Pämirakud	25
2.2.5 Pämirakkude transformatsioon	25
2.2.6 Pärm kasvukiiruse mõõtmine	26
2.2.7 Ultratsentrifuugimine lineaarses sahharoosi gradiendis.....	26
2.2.8 Bioinformaatiline analüüs	27
2.3 Tulemused ja arutelu	28
2.3.1 WBSCR22 valgu lokaliseerimine imetaja rakkudes.....	28

2.3.1.1 WBSR22 valgu deletsiooni- ja punktmutantide EGFP liitvalkude ekspressiooniplasmiidide konstrueerimine	28
2.3.1.2 WBSR22 valgu lokalisatsiooni ja seda määravate determinantide iseloomustamine	30
2.3.2 WBSR22 valgu funktsionaalsus pärmis	38
2.3.2.1 WBSR22 valgu mutantide pärmis kasutatavate ekspressiooniplasmiidide konstrueerimine	38
2.3.2.2 WBSR22 valgu mõju rakkude kasvule pärmis Bud23-defektses tüves	39
2.3.2.3 WBSR22 valgu mõju Bud23-defektsete rakkude ribosoomide biogeneesile	45
Kokkuvõte	49
Summary	50
Tänuõnad	52
Kasutatud kirjandus	53
Kasutatud veebiaadressid	63
Lisad	64
Lisa 1. WBSR22 homologide joondus	64
Lihtlitsents	66

Kasutatud lühendid

AdoMet	- S-adenosüül-L-metioniin (<i>S-adenosyl-L-methionine</i>)
CHX	- tsükloheksimiid (<i>cycloheximide</i>)
CNV	- koopiarvu variatsioon (<i>copy number variation</i>)
CTD	- karboksüterminaalne domeen (<i>carboxy-terminal domain</i>)
ETS	- väline transkribeeritud järjestus (<i>external transcribed spacer</i>)
ITS	- sisemine transkribeeritud järjestus (<i>internal transcribed spacer</i>)
LCR	- madalakoopiaarvuline kordusjärjestus (<i>low-copy repeat</i>)
LSU	- ribosoomi suur subühik (<i>large subunit</i>)
Merm1	- metastaaside moodustumisega seotud metüültransferaas 1 (<i>metastasis-related methyltransferase 1</i>)
MTD	- metüültransferaasne domeen (<i>methyltransferase domain</i>)
NAHR	- mittealleelne homoloogiline rekombinatsioon (<i>nonallelic homologous recombination</i>)
NLS	- tuuma lokalisatsiooni signaal (<i>nuclear localization signal</i>)
NPC	- tuuma poori kompleks (<i>nuclear pore complex</i>)
snoRNP	- väike tuumakese ribonukleoproteiinne partikkel (<i>small nucleolar ribonucleoprotein particle</i>)
SSU	- ribosoomi väike subühik (<i>small subunit</i>)
WBS	- Williams-Beureni sündroom (<i>Williams-Beuren syndrome</i>)
WBSCR20	- Williams-Beureni sündroomi kromosoomi regioon 20 (<i>Williams-Beuren syndrome chromosomal region 20</i>)
WBSCR22	- Williams-Beureni sündroomi kromosoomi regioon 22 (<i>Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22</i>)
WT	- metsiktüüpi (<i>wild type</i>)

Sissejuhatus

Williams-Beureni sündroomi kromosoomiregiooni 22. (WBSCR22 - *Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22*) geen paikneb piirkonnas, mis Williams-Beureni sündroomi (WBS - *Williams-Beuren syndrome*) korral on deleteerunud. WBS on harvaesinev multisüsteemne arenguhäire, mida põhjustab umbes 28 geeni pikkune deletsioon 7. kromosoomi pikas õlas. Enamike WBS piirkonnast ekspresseeritavate valkude täpsed funktsioonid ning nende roll haiguse fenotüübi kujunemisel ei ole veel selged.

WBSCR22 valk omab metüültransferaasides konserveerunud S-adenosüül-L-metioniini (AdoMet - *S-adenosyl-L-methionine*) seondavat domeeni ning kaheosalist tuuma lokalisatsiooni signaali (NLS - *nuclear localization signal*). AdoMet-sõltuvad metüültransferaasid metüleerivad laial hulgal rakulisi substraate, WBSCR22 valgu metüülatsioonisubstraat pole aga teada. Mitmete vähivormide puhul on näidatud WBSCR22 valgu üleekspressiooni vähirakkudes ning tema metüültransferaasse domeeni olulisust metastaaside moodustumisel. Lisaks on näidatud vähirakkude elulemuse ning metastaaside moodustumise vähenemist WBSCR22 geeniekspressiooni allasurumisel. WBSCR22 valk osaleb ka ribosoomi 40S subühiku biogeneesis. WBSCR22 valgu geeniekspressiooni mahasurumisel aeglustus ribosoomi 40S subühiku biosünteesi häirumise tõttu oluliselt rakkude kasv. See näitab, et WBSCR22 valk on oluline normaalseks rakkude kasvuks.

WBSCR22 valk komplementeerib osaliselt ka pärmi *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, mis näitab, et WBSCR22 ja tema homoloogi Bud23 funktsioonid on evolutsioonis vähemalt osaliselt konserveerunud. Bud23 metüleerib 18S rRNA-d ning on vajalik ribosoomi 40S subühiku biogeneesis.

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks on iseloomustada WBSCR22 valgu lokalisatsiooni ja seda määravaid determinante ning analüüsida, kas WBSCR22 valgu lokalisatsioon tuumakesse on vajalik tema aktiivsuseks pärmis.

Töö on koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: Williams-Beureni sündroom, metüültransferaas, tuumake, ribosoomide biogenees, 40S subühik

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 7q11.23 piirkonna ümberkorraldused

Inimese 7. kromosoomi q11.23 piirkond, mida nimetatakse ka Williams-Beureni sündroomi kromosoomiregiooniks, koosneb ligikaudu 1.2 Mb pikkusest ühekoopialisest kodeerivast genoomipiirkonnast, millega külgnevad mõlemalt poolt suured madalakoopiaarvulised kordusjärjestused (LCR - *low copy repeats*) (Schubert, 2008). LCR-d jagunevad kolme ploki: A, B, C, mis varieeruvad 44 kuni 146 kb pikkuseni. Plokid paiknevad komplekselt, sisaldades vähemalt kolme kõrge homoloogiaga (kuni 99,5%) LCR koopiat, mis paiknevad tsentromeerselt (c - *centromeric*), mediaalselt (m - *medial*) või telomeerselt (t - *telomeric*) (Gu ja Lupski, 2008). Tsentromeersete ja mediaalsete LCR plokkide orientatsioon on sama, kuid nende järjekord on erinev. Kolmas plokk paikneb telomeersemtalt ning samas järjekorras nagu tsentromeerne LCR, kuid vastupidises orientatsioonis. WBS ühekoopialine genoomipiirkond paikneb Cm ja Bm plokkide vahel (Bayés jt, 2003). WBS piirkonna skeem on toodud välja joonisel 1.

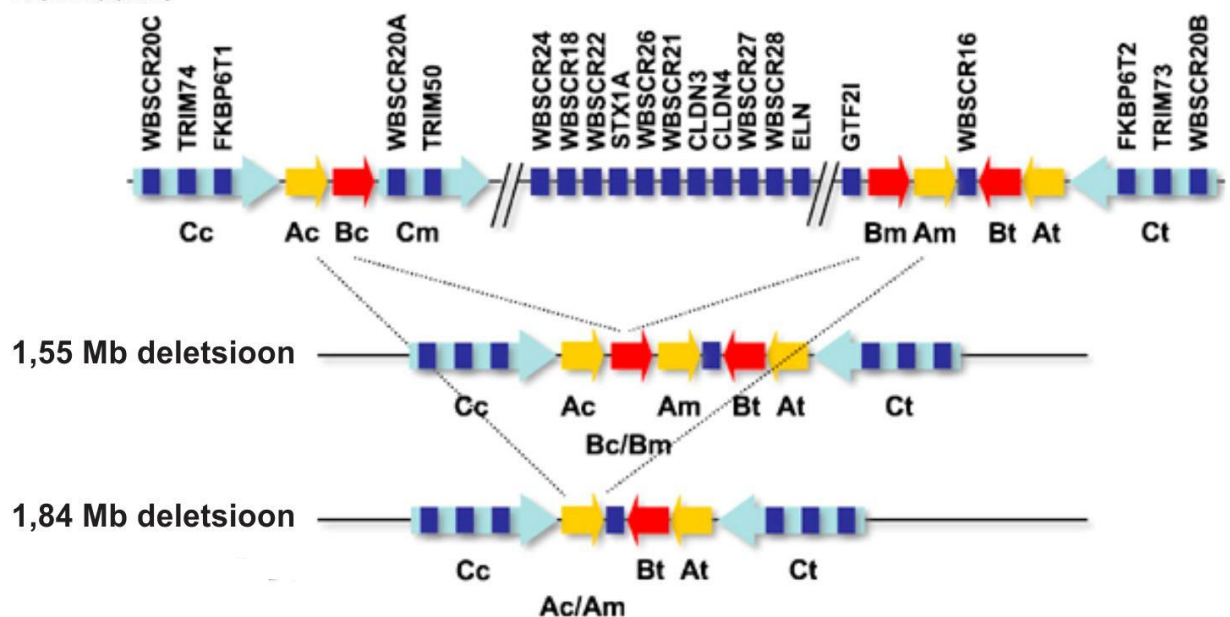
Genoomsed struktuurid, nagu kompleksed LCR-d, mis sisaldavad mitmeid külgnevaid tandeemseid ja vastupidises orientatsioonis LCR elemente, pakuvad baasi mitmetele struktuursetele ja koopiarvu variatsioonidele (CNV - *copy number variation*), sealhulgas erinevates pikkustes ja mitmesugustes kombinatsioonides duplikatsioonidele, deletsioonidele, inversioonidele. CNV-d võivad põhjustada mendeliaalseid, sporaadilisi või kompleksseid haiguseid doosiefekti, geeni lõhkumise, geenide liitumise, positsiooniefekti ning muude molekulaarsete mehhanismide kaudu (Zhang jt, 2009).

LCR-d 7q11.23 piirkonnas põhjustavad suurt genoomset ebastabiilsust LCR elementide vahelise mittealleelse homoloogilise rekombinatsiooni (NAHR - *nonallelic homologous recombination*) kaudu (Cuscó jt, 2008). NAHR on põhjustatud kahe mittealleelse suure sarnasusega DNA järjestuse paardumisest ja ebavõrdsest ristsiirdest (Zhang jt, 2009). Valesti paardunud LCR-de vaheline NAHR põhjustab WBS deletsioone, mis on enamikel juhtudel sama pikad. Enamikel WBS patsientidel (89%) esineb 1,55 Mb deletsioon Bc ja Bm plokkide vahel. Umbes 8% juhtudel esineb pikem, 1,8 Mb pikkune, deletsioon Ac ja Am plokkide vahel. Ainult 2-3% esinevad ebatüüpilised deletsioonid (Cuscó jt, 2008). Klassikalised deletsioonid on välja toodud joonisel 1 (vt 1,55 Mb deletsioon ja 1,84 Mb deletsioon).

Kui intrakromatiidne NAHR põhjustab deletsiooni ja retsiiprookse tsirkulaarse atsentrilise kromosoomi tekke, siis interkromosomaalne ja interkromatiidne NAHR viib deletsiooni ja retsiiprookse duplikatsiooni tekkeni. WBS ja 7q11.23 duplikatsioonisündroomi esinemise suhe on 2:1. See võib olla põhjustatud sellest, et kromatiidisene NAHR tekitab deletsiooni ja atsentrilise kromosoomi tekke, kuid mitte duplikatsiooni. Samuti võib duplikatsioonisündroom olla aladiagnoositud (Schubert, 2008).

Kromatiidisene NAHR võib ümberpööratud homoloogsete tsentromeersete ja telomeersete LCR plokkide valepaardumisel tekitada erineva pikkusega paratsentrilisi inversioone. WBS piirkonna inversioon soodustab kromosoomide valepaardumist meioosis, mis võib viia WBS piirkonna deletsiooni või duplikatsioonini. WBS inversiooni kandjal on risk saada WBS-ga laps isegi kuni 1/500 (Schubert, 2008).

Normaalne



JOONIS 1. 7q11.23 piirkonna transkriptide skeem normaalse (ülemine) ja klassikaliste WBS deletsioonide korral (keskmise 1.55 Mb ja alumise 1.84 Mb pikkune deletsioon). Madalakoopiaarvuliste korduste erinevad tsentromeersed (c), mediaalsed (m) ja telomeersed (t) duplikonid on märgitud nooltega, mis näitavad nende suhtelist orientatsiooni ja tüüpi (A plokk: kollane nool (A); B plokk: punane nool (B); C plokk: helesinine nool (C)). Transkriptid on märgitud tumesiniste nelinurkadega ja nende kohal on välja toodud nende nimetused (Micale jt, 2008 järgi).

1.2 Williams-Beureni sündroom

Williams-Beureni sündroom on harvaesinev geneetiline haigus, mida põhjustab hemisügootne, umbes 1,6 Mb pikkune mikroleetsioon 7. kromosoomi pikast õlast q11.23 piirkonnast. WBS deleetsioonipiirkond hõlmab endas umbes 26-28 geeni (Schubert, 2008). WBS esinemissagedus on 1/7500 kuni 1/20000 (Smoot jt, 2005). WBS esineb enamikel juhtudel sporaadiliselt (*de novo*), kuid esineb üksikuid juhtumeid autosoomdominantsel pärandumisel edasi kandunud haigusest. Vanematelt edasi kandunud haigusjuhtudel esines haigust kandval vanemal ainult kergete või väheste sümptomitega WBS (Schubert, 2008). Enamik Williams-Beureni sündroomiga täiskasvanuid otsustavad lapsi mitte saada, kuid neil, kes soovivad siiski last saada, esineb 50% tõenäosus, et WBS pärandub järglasele (Pober, 2010).

WBS on multisüsteemne arenguhäire, mille tüüpilisteks sümptomiteks on kardiovaskulaarsed ning sidekoe arenguhäired, endokriinsüsteemi häired, kasvupeetus, enneaegne vananemine, vaimne alaareng, ülisõbralikkus ning iseloomulikud näojooned (Morris, 2010; Pober, 2010; Smoot jt, 2005).

7q11.23 piirkonna duplikatsiooni korral on sümptomid kergemad ning erinevad oluliselt WBS-st. Kognitiivne profiil hõlmab endas puudujääke keelelistes oskustes, arenguhäireid ning autistlikke jooni. WBS piirkonna inversiooni puhul üldiselt kliinilised sümptomid aga puuduvad (Pober, 2010).

Williams-Beureni sündroomi kromosoomipiirkonnast kodeeritavaid valke on veel vähe uuritud. Selge genotüübi ja fenotüübi vaheline korrelatsioon on tuvastatud vaid elastiini geeni kohta, mis on vastutav vaskulaarsete ja sidekoe häirete eest. Ülejäänud 7q11.23 piirkonna kliiniliste tunnuste eest vastutavad molekulaarsed substraadid on veel ebaselged (Merla jt, 2010).

Sondall ja Baserga (2014) pakuvad välja, et WBS võiks olla uus ribosomopaatia. Williams-Beureni sündroomil on mitmeid erinevatele ribosomopaatiatele iseloomulikke jooni: kaasasündinud südamerikked, näokolju iseäralik kuju (esinevad ka näiteks Treacher Collinsi sündroomi ja Diamondi-Blackfani aneemia puhul (Freed jt, 2010; Narla ja Ebert, 2010)), enneaegne vananemine, kasvupeetus, hüperkaltseemia ja kognitiivsed häired (Sondall ja Baserga, 2014). Inimese WBSCR22 valk mõjutab ribosoomi väikese subühiku biogeneesi ja 18S rRNA protsessingut (Õunap jt, 2013). WBSCR22 valgu homoloog pärmsis, Bud23,

interakteerub SSU (*small subunit* - väike subühik) protsessoomi komponentidega ning metüleerib 18S rRNA m⁷G1575 (White jt, 2008; Sardana jt, 2013). Williams-Beureni sündroomi kromosoomiregiooni 20 (WBSCR20 - *Williams-Beuren syndrome chromosomal region 20*) valgule, mis on väga sarnane WBSCR22-le, on ennustatud rolli pre-rRNA protsessingul või ribosoomi assambleerimisel (Doll ja Grzeschik, 2001). WBSCR20 geen paikneb Cm piirkonnas (vt joonisel 1 WBSCR20A) ning tema kärbitud koopiad (WBSCR20B ja WBSCR20C) paiknevad teistes C plokkides. Hiire mudelsüsteemis on näidatud, et WBSCR20 võib olla oluline normaalses näokolju arengus, mis WBS korral on häiritud (Chi ja Delgado-Olguin, 2013). WBSCR20 valgu homoloog pärmis on Rcm1 metüültransferaas. Rcm1 metüleerib 25S rRNA-d positsioonis C2278 ning selle metülatsiooni puudumine mõjutab ribosoomide sünteesi ja protsessingut. Rcm1 on kõrgelt konserveerunud ning see viitab tema sarnasele rollile ka kõrgemates eukarüootides, sealhulgas inimesel (Sharma jt, 2013). WBSCR20 ja WBSCR22 hemisügootne deletsioon põhjustab nende geeniproduktide haplopuudulikkust, mis on sarnane paljudele teistele ribosomopaatiatele. Tingituna WBSCR22 homoloogiast SSU protsessoomi komponendile Bud23-le ja WBSCR20 ennustatud rollist ribosoomide biogeneesis ning tema homoloogiast pärmi rRNA metüültransferaasile Rcm1-le, võiks Williams-Beureni sündroom olla uus ribosomopaatia (Sondall ja Baserga, 2014). Antud magistritöö keskendub WBS piirkonnast ekspresseeritava valgu WBSCR22 uurimisele.

1.3 WBSCR22 valk

WBSCR22 geen koosneb 12-st eksonist, mis koos intronitega katavad 45 kb genoomsest DNA-st. 843 bp suurune transkript kodeerib 281-st aminohapest koosnevat WBSCR22 valku, mille ennustatud molekulmass on 31,8 kDa ja isoelektriline punkt 8,95 (Doll ja Grzeschik, 2001).

WBSCR22 valk omab ubiE/COQ5 metüültransferaaside perekonnale sarnast aminohappelist järjestust, mida iseloomustab metüültransferaasides konserveerunud S-adenosüül-L-metioniini seondav domeen. Valgu C-terminaalses osas paikneb kaheosaline tuuma lokaliseerimise signaal (Doll ja Grzeschik, 2001).

AdoMet-sõltuv metülatsioon on keskne paljude bioloogiliste protsesside regulatsioonil. Inimese proteoomi bioinformaatilisel analüüsil leiti 208 teadaolevat ja ennustuslikku AdoMet-sõltuvat metüültransferaasi geeni, mis moodustavad ligikaudu 0,9% inimese genoomist. 30% neist valkudest on seostatud haigustega, näiteks vähi ja vaimse alaarenguga

(Petrosian jt, 2011). AdoMet-sõltuvad metüültransferaasid metüleerivad erinevaid rakulisi substraate, sealhulgas nukleiinhappeid, valke, lipiide ja väikeseid molekule. Metülatsioonitsükli osalevate ensüümide puudujäägid näitavad, et paljud neist on seotud suure hulga patoloogiatega, sealhulgas lipiidide metabolismi regulatsiooni häirumisega, neuroloogiliste häiretega, tumorigeensusega, oksüdatiivse stressiga ja müopaatiaga (Tehlivets jt, 2013). WBS patsientide naha fibroblastide transkriptoomi analüüsimisel näidati, et WBSCR22 geeniekspressioon on WBS korral oluliselt alla reguleeritud võrreldes kontrollgrupiga (Henrichsen jt, 2011). WBS patsientide lümfoblastoidsetes rakuliinides on WBSCR22 valgu tase ligi 2,5 korda madalam võrreldes kontrollgrupiga (Õunap jt, 2013). WBS patogeneesis võivad WBSCR22 geeni hemisügootsest deletsioonist tulenevad metülatsiooni defektid olla vastutavad kasvupeetuse, müopaatia ja enneaegse vananemise eest (Doll ja Grzeschik, 2001).

WBSCR22 valgu metülatsioonisubstraat pole teada. WBSCR22 valgu joendamisel metüültransferaaside järjestustega on WBSCR22-le ennustatud DNA-d metüleerivat aktiivsust (Doll ja Grzeschik, 2001). Nakazawa jt (2011) väitsid aga, et WBSCR22 osaleb histoonide metüleerimisel. Sarnaselt Bud23-le, WBSCR22 homoloogile pärmis, võib tema funktsioon olla seotud ka rRNA metüleerimisega (White jt, 2008).

WBSCR22 valgu ekspressiooni on näidatud paljudes inimese kudedes, kuid tugevamalt ekspresseerus see südames, skeetilihastes, neerudes, põrnas, maksas, kopsudes, testistes ja primaarsetes plasmarakkudes (Doll ja Grzeschik, 2001; Merla jt, 2002; Tiedemann jt, 2012). Munarakku ümbritsevates *cumuluse* rakkudes, mis on munarakuga tihedalt kontaktis, on näidatud WBSCR22 geeniekspressiooni allareguleerimist inimese menopausaalse gonadotropiini manustamisel ning geeniekspressiooni ülesreguleerimist rekombinantse inimese luteiniseeriva hormooni ja rekombinantse inimese folliikuleid stimuleeriva hormooni koos manustamisel võrreldes kontrollgrupiga (Gatta jt, 2013). Folliikuli arengul ja munaraku küpsemisel olulist rolli mängivate geenide ekspressiooni reguleerivate hormoonide mõju WBSCR22 geeniekspressioonile ning WBSCR22 kõrge geeniekspressioonitase testistes viitavad sellele, et WBSCR22 valk on oluline gameetide arengus.

Mitmed uurimused on näidanud WBSCR22 üleekspressiooni vähirakkudes. Nakazawa jt (2011) näitasid, et WBSCR22 on üleeksprimeeritud melanoomis ja invasiivses rinnavähis ning soodustab metastaaside teket. Metastaaside moodustumisel oli oluline WBSCR22 valgu AdoMet-sõltuv metüültransferaasne domeen. Endogeense WBSCR22 geeniekspressiooni

mahasurumine siRNA abil vähendas metastaaside teket, mistõttu nimetasid autorid WBSCR22 ümber metastaaside moodustumisega seotud metüültransferaas 1-ks (*Merm1 - metastasis-related methyltransferase 1*). Merm1 surus alla tuumor-supressor geeni, *Zac1*, ekspressiooni, metüleerides tema promootorpiirkonnas paiknevat histooni H3 positsioonis Lys⁹, inhibeerides sellega p53-sõltuvat apoptoosi ja soodustades rakkude ellujäämist, mis on otseselt seotud vähirakkude metastaaside moodustamise võimega. Seega võiks WBSCR22 olla potentsiaalne märklaud vähivastaste terapeutikumide arendamisel (Nakazawa jt, 2011).

Tiedemann jt (2012) järgi on WBSCR22 potentsiaalseks selektiivseks sihtmärgiks hulgimüeloomi terapeutilisel ravil. WBSCR22 geeniekspressiooni tase on hulgimüeloomi ning ka inimese primaarsetes plasmarakkudes enamike teiste inimese somaatiliste rakkudega võrreldes üle kümne korra kõrgem. WBSCR22 geeniekspressiooni mahasurumisel RNA interferentsi abil on hulgimüeloomi rakkude elulemus võrreldes teiste rakkudega aga kaks korda väiksem, mis viitab WBSCR22 valgu olulisusele ka plasmarakkude bioloogias (Tiedemann jt, 2012).

Jangani jt (2014) pakuvad välja, et WBSCR22 on uus kromatiini struktuuri modulaator, reguleerides glükokortikoidi retseptori seondumist selle vastuselementidele, ning vähendades sellele järgnevat H3-Lys⁹ trimetüleerimist. Lisaks näitavad nad, et WBSCR22 geeniekspressiooni tase bronhiaalepiteelis on teiste kudedelega võrreldes kõrgem, kuid on oluliselt alla reguleeritud kopsu põletikuliste ja neoplastiliste seisundite korral.

Lisaks on näidatud, et WBSCR22 geeni promootorpiirkond on maksavähi rakkudes hüpometüleeritud ning seetõttu on WBSCR22 ekspressioon aktiveeritud. WBSCR22 geeniekspressiooni vaigistamine inimese maksavähi rakkudes inhibeerib vähirakkude kasvu ja invasiivsust, kuid ei mõjuta normaalsete maksarakkude kasvu, mis viitab WBSCR22 geeni põhjuslikule rollile vähirakkude vohamises ja metastaaside moodustumisel ning on seega ka potentsiaalseks märklauaks vähiteraapias (Stefanska jt, 2014).

Kahes suuremahulises sõeluuringus näidati, et WBSCR22 on vajalik ribosoomi 40S subühiku biogeneesis (Wild jt, 2010; Tafforeau jt, 2013). WBSCR22 geeniekspressiooni mahasurumine siRNA abil põhjustas ribosoomi 18S-E prekursori akumulierumist (Tafforeau jt, 2013). Meie töögrupi tulemused näitavad samuti, et WBSCR22 valk osaleb 18S rRNA protsessingul ja ribosoomi 40S subühiku biogeneesil. WBSCR22 geeniekspressiooni mahasurumine siRNA abil viib tsütoplasmas ribosoomi 40S subühiku hulga vähenemiseni võrreldes 60S subühikuga, mis viitab pre-40S partiklite protsessingu ja ekspordi defektidele. WBSCR22

valk komplementeerib osaliselt ka pärmi *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, viidates sellele, et WBSCR22 valk omab oma homoloogi, Bud23-ga, sarnast funktsiooni ribosoomide biogeneesis (Õunap jt, 2013).

WBSCR22 on eukarüootides kõrgelt konserveerunud, kuid vaid väheseid WBSCR22 homolooge on kirjeldatud (White jt, 2008; Ohbayashi jt, 2011; Merla jt, 2002). RID2 valk müürloogas on vajalik raku jagunemisel ning pre-rRNA protsessingul tuumakeses. *rid2-1* mutatsioon põhjustas erinevate pre-rRNA intermediaatide akumulereumise (Ohbayashi jt, 2011). Hiire Wbscr22 valgu puhul (Inimese WBSCR22 ja hiire Wbscr22 valgud on kõrge homoloogiaga, omades 80% identsust aminohappelises järjestustuses (Merla jt, 2002).) on näidatud, et tema geeniekspressiooni tase närvisüsteemi mikroglia rakkudes tõuseb rakkude vananemisel üle seitsme korra, mis viitab sellele, et WBSCR22 valk on oluline normaalses vananemises ning võib WBS korral olla vastutav enneaegse vananemise sümptomite eest (Orre jt, 2014). Kõige enam on uuritud aga Bud23, WBSCR22 homoloogi pärmis, mis metüleerib 18S rRNA-d ning on vajalik ribosoomide biosünteesiks (White jt, 2008).

1.4 Bud23 on WBSCR22 homoloog pärmis

BUD23 identifitseeriti *Saccharomyces cerevisiae* metüültransferaaside bioinformaatilisel analüüsil, kus AdoMet-sõltuvate metüültransferaaside konserveerunud motiive joondati kogu pärmi genoomi vastu. Lisaks näidati, et *BUD23* geeni lõhkumine (*gene disruption*) põhjustab mutantse pärmitüve aeglast kasvu (Niewmierzycka ja Clarke, 1999). Bud23 on oluline ka bipolaarse pungumismustri moodustumisel, kuna Bud23 diploidne mutant põhjustas juhusliku pungumismustri teket (Ni ja Snyder, 2001).

Bud23 metüleerib ribosoomi väikese subühiku P-saidis paiknevat 18S rRNA-d G1575 positsioonis. *BUD23* geeni deletsioon põhjustab defekte 20S rRNA protsessimisel 18S rRNA-ks ning 40S subühiku eksportimisel tuumast tsütoplasmasse, kusjuures 40S subühiku biogeneesis ja eksprodil ei ole vajalik Bud23 metüültransferaasi aktiivsus (White jt, 2008). Ribosoomi väikese subühiku biogeneesi defekti *BUD23* deleteerimise korral näidati ka laiaulatuslikus ribosoomide biogeneesis osalevate valkude uuringus (Li jt, 2009). Bud23 interakteerub geneetiliselt ribosoomi 40S subühiku biogeneesis osalevate Rps15p ja Mex67 valkudega, põhjustades *bud23Δ* ja vastavalt *rps15-1* ja *mex67ΔC1* topeltmutantidel sünteetilist letaalsust või mutantse fenotüübi võimendamist (Bellemer jt, 2010; Faza jt, 2012).

S-Adenosüül-L-metioniini mitteseondava mutandi Bud23(G57R)-ga on näidatud, et Bud23 valgu metüültransferaasne aktiivsus ei ole oluline *Saccharomyces cerevisiae* pungumiskoha valikul. Bud23(G57R) valk komplementeerib Bud23-defektse pärmitüve aeglast kasvu ning juhusliku pungumismustri teket füsioloogilistel tingimustel. G57R üleekspressioonimutandi puhul aga komplementatsiooni ei toimu ning lisaks täheldati rakkude aeglasele kasvule ja juhusliku pungumismustri moodustumisele uusi fenotüüpe, mis *bud23Δ* tüve puhul puudusid, näiteks muutused aktiini paiknemises, kitiini ümber lokaliseerumine ja väljavenitatud pungad, mis on iseloomulikud septiini mutantidele (Lin jt, 2012). Septiinid on eukarüootides konserveerunud GTP-d siduvad polümeriseeruvad valgud, millel on oluline roll tsütokineesis ja rakkude septatsioonil ehk rakkude jagunemisel (Longtine ja Bi, 2003). Kuna Bud23(G57R) lokaliseerub tuuma, ei saa ta osaleda otseselt septiini ringi moodustumisel (Lin jt, 2012). Läbi suuremahuliste valgukomplekside analüüsi on näidatud, et Bud23 interakteerub transkriptsioonifaktori Reb1-ga, mille geen interakteerub geneetiliselt *CDC12*-ga, mis on oluline septiini ringi moodustumisel (Krogan jt, 2006; Davierwala jt, 2005). Seega võib Bud23(G57R) üleekspressioon mõjutada kaudselt septiini ringi moodustumist (Lin jt, 2012).

Bud23-vahendatud 18S ribosomaalse RNA metülatsiooniks ja ribosoomi 40S subühiku moodustumiseks on vajalik Trm112 (Figaro jt, 2012). Trm112 on väike tsink-sõrme motiiviga valk, mis on koaktivaatoriks mitmele AdoMet-sõltuvalle metüültransferaasile (Mazauric jt, 2010). Trm112 seondumine Bud23 valguga on vajalik Bud23 stabiilsuseks. *trm112Δ* rakkudes on 40S subühiku moodustumine defektne ega toimu Bud23-vahendatud 18S rRNA G1575 metülatsiooni. Bud23 ei saa Trm112 puudumisel seonduda pre-ribosoomidele ning see põhjustab pre-ribosoomide degradatsiooni (Figaro jt, 2012). Sardana ja Johnson (2012) näitasid samuti, et Trm112 on vajalik Bud23-vahendatud ribosoomi väikese subühiku biogeneesiks ning *TRM112* deletsioon põhjustab *bud23Δ* tüvele iseloomulikke mutantset fenotüüpi.

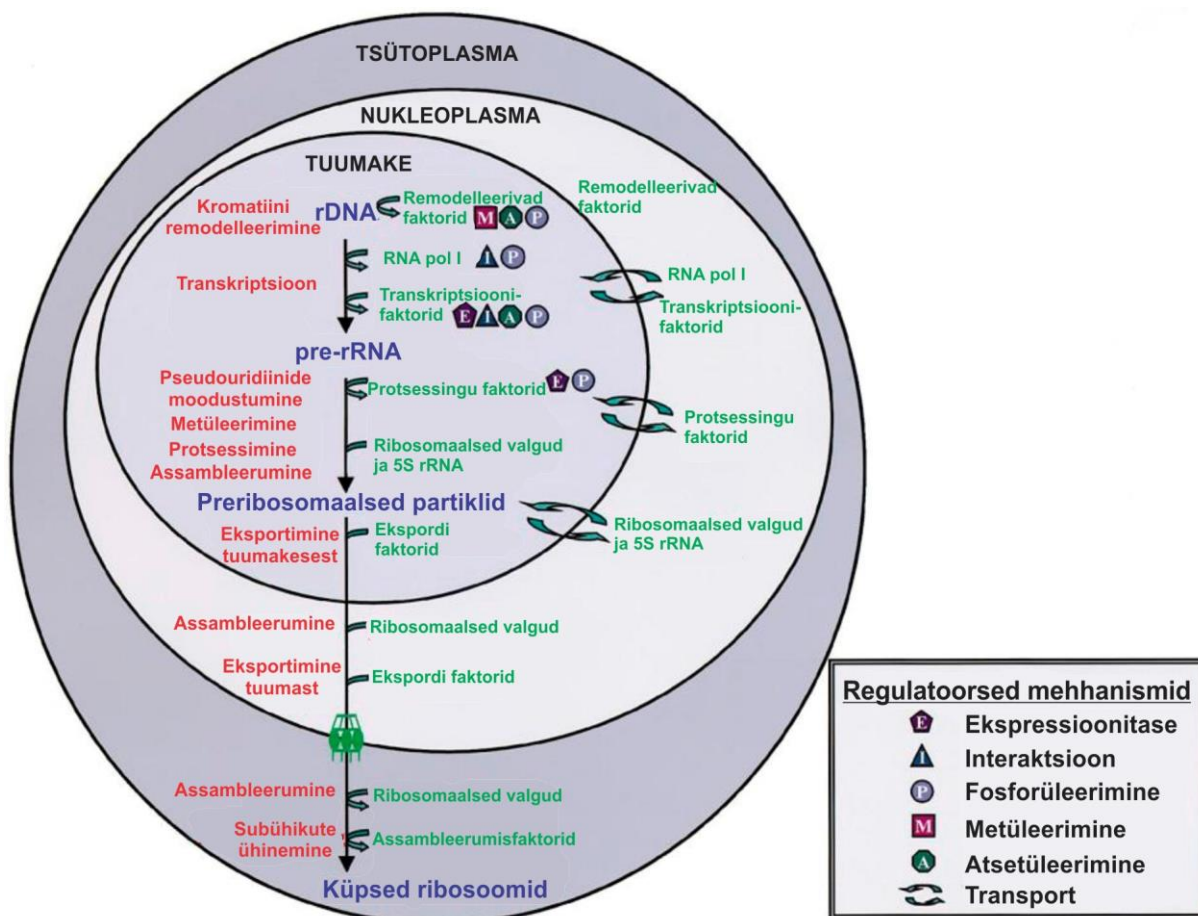
Bud23 on vajalik pre-ribosoomide protsessinguks A₂ lõikesaidist ning omab geneetilisi interaktsioone mitmete SSU komponentidega. Bud23 võib olla vajalik SSU protsessiooni vabanemise (*disassembly*) initsiaatoriks. Bud23 interakteerub Utp2 ja Utp14, kuid mitte ühegi teise varase SSU protsessiooni faktoriga, mis võib olla põhjustatud nende interaktsioonide ajutisest iseloomust või SSU protsessiooni faktorite samaaegsest vabanemisest, kui Bud23 interakteerub partikliga. *BUD23* deletsioon põhjustab mitmete SSU protsessiooni komponentide püsivat nukleoplasmaatilist rikastumist. Kui nende komponentide õigeaegne vabanemine on takistatud, võib see lukustada need faktorid mitteaktiivsetesse

intermediaatidesse, blokeerides niimoodi nende osalemise järgnevates pre-rRNA protsessingu ringides. *bud23Δ* mutandi SSU tsütoplasmasse eksportimise defekt võib olla kaudselt põhjustatud sellest, et SSU komponentide vabanemine on takistatud. *BUD23* omab geneetilist interaktsiooni ka RMRP komponentidega. Kuna *bud23Δ* mutandil on pre-ribosoomi protsessimine A₂ lõikesaidist takistatud, on vaja pre-40S partikli vabanemiseks alternatiivset kotranskriptsioonilist lõikamist A₃ saidist, mille eest vastutab RMRP (Sardana jt, 2013). Bud23 interakteerub nii füüsiliselt kui funktsionaalselt ka DEAH-box RNA helikaasiga Ecm16, mis on vajalik A₂ lõikuseks. Mutatsioonid *ECM16* geenis surusid alla *bud23Δ* mutandi kasvu- ning A₂ lõikuse defektid. Bud23 liitumine SSU protsessoomiga viib selle komponentide vabanemiseni (vt A₂ lõikuse järgset ribosomaalsete faktorite vabanemist jooniselt 4) tõenäoliselt läbi RNA helikaasi Ecm16 stimuleerimise (Sardana jt, 2014). Seega on Bud23 valk oluline ribosoomi väikese subühiku biogeneesis kesk-faasi pre-40S partikli moodustumisel varajasest 90S partiklist.

1.5 Ribosoomide biogenees

Ribosoomid on tsütoplasmas paiknevad kõrgelt konserveerunud molekulaarsed kompleksid, mis viivad läbi valgusünteesi. Ribosoomide biogenees on keeruline ja väga täpselt koordineeritud protsess. Praeguseks on suurem osa eukarüootide ribosoomide biogeneesi käsitlevatest uurimustest tehtud pagaripärmis ning seetõttu käsitlem ribosoomide biogeneesi pärmi näitel. Ribosoomid koosnevad kahest subühikust, 40S ehk väikesest ja 60S ehk suurest subühikust (LSU - *large subunit*). Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi väike subühik koosneb 18S rRNA-st ja 33-st erinevast ribosomaalsest valgust, suur subühik koosneb aga kolmest rRNA-st (5S; 5,8S; 25S) ja 46-st ribosomaalsest valgust. SSU on ribosoomi dekodeerivaks tsentriks, viies kokku mRNA ja aminoatsüleeritud tRNA. LSU piirkonnas toimub peptidüültransferaasne reaktsioon, mis katalüüsib peptiidsideme moodustumist. Lisaks ribosomaalsetele valkudele osaleb ribosoomide biosünteesil üle 200 *trans*-aktiveeriva faktori ja 76 väikest tuumakese RNA-d. Ribosoomide biosüntees algab rRNA sünteesiga tuumakeses, kus RNA läbib kompleksseid modifikatsioone, sealhulgas kokkupakkimine, nukleotiidide modifikatsioonid, ITS ja ETS järjestuste eemaldamine, ning ribosomaalsete ja *trans*-aktiveerivate valkude seondumine. Sellele järgneb preribosoomide eksport tuumast tsütoplasmasse, kus toimub nende lõplik küpsemine funktsionaalseteks ribosoomideks. Lisaks on olemas veel põhjalikud mehhanismid, mis monitoorivad ribosoomide korrektset struktuurset ja funktsionaalset küpsemist ning lagundavad need preribosoomid, mis ei moodustu korrektselt (Fromont-Racine jt, 2003; Strunk ja Karbstein,

2009; Kressler jt, 2010; Panse ja Johnson, 2010; Woolford Jr ja Baserga, 2013). Ribosoomide biogeneesi ning selle regulatsiooni ülevaatlisk skeem on toodud välja joonisel 2.



JOONIS 2. Ribosoomide biogeneesi regulatsioonietappide skeem. Funktsionaalsed etapid on märgitud punasega, nendes osalevad *trans*- aktiveerivad faktorid on näidatud rohelisega. Biogeneesi etappide substraadid/produktid on märgitud sinisega (Leary ja Huang, 2001 järgi).

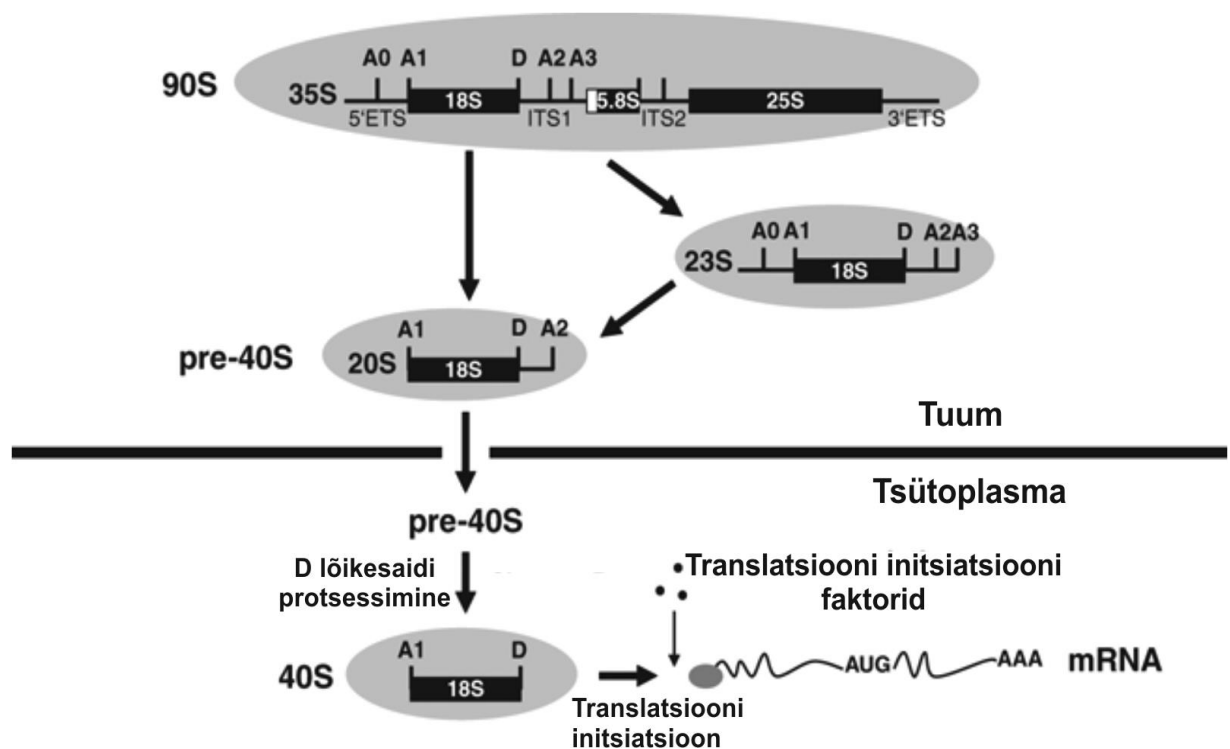
Kuna ribosoomide biogeneesil on keskne roll rakkude elutegevuses, võivad defektid ribosoomide biosünteesil omada kahjulikke efekte raku metabolismile ja elulemusele. Ribosoomide biogenees on oluline ka rakutsükli mõjutajana, reguleerides rakkude suurust ja kasvu. Aktiivselt jagunevates rakkudes sünteesitakse palju ribosome, samas kui toitainetepuuduses ribosoomide biosüntees aeglustub (Jorgensen jt, 2004; Dez ja Tollervey, 2004; Lempiäinen ja Shore, 2009). Seetõttu on ka vähi korral ribosoomide süntees üles reguleeritud (Ruggero ja Pandolfi, 2003).

1.5.1 pre-40S rRNA moodustumine

Eukarüootide ribosoomide biosüntees initsieeritakse tuumakeses, kus sünteesitakse esmalt polütsistroomne 35S pre-rRNA, mis sisaldab küpsete 18S, 25S ja 5,8S rRNA-de järjestusi ning lisaks 5' ja 3' väliseid transkribeeritud järjestusi (ETS - *external transcribed spacer*) ning sisemisi transkribeeritud järjestusi ITS1 (*internal transcribed spacer*) ja ITS2. 35S pre-rRNA transkriptsiooni viib läbi RNA polümeraas I. 5S rRNA sünteesitakse eraldi RNA polümeraas III poolt. Valmivat 35S pre-rRNA-d modifitseeritakse kotranskriptsiooniliselt ligi 75 erineva väikese tuumakese ribonukleoproteiinse partikli (snoRNP - *small nucleolar ribonucleoprotein particle*) poolt, mis vahendavad nukleotiidide 2'-O-riboosi metüleerimist ja pseudouridiinide moodustumist. snoRNP kompleksid seonduvad oma substraadile läbi snoRNA ja rRNA vahelise aluspaardumise ning nendega seotud valgud katalüüsivad modifikatsioonireaktsioone. 35S pre-RNA-le seonduvad veel ribosomaalsed valgud ja *trans*-aktivatsioonifaktorid, mille tulemusel moodustub 90S partikkel (Phipps jt, 2011; Kressler jt, 2010; Fromont-Racine jt, 2003).

90S partiklisse kuuluvat 35S rRNA-d lõigatakse 5' ETS järjestuselt kõigepealt saidist A₀ (35S rRNA struktuur ja lõikesaidid on näha joonisel 3), moodustades 33S rRNA, ning seejärel A₁ lõikesaidist, mis on küpse 18S rRNA 5' ots, moodustades 32S pre-rRNA. Järgnevalt lõigatakse pre-rRNA-d saidist A₂ ITS1 järjestusel ning vabaneb pre-40S subühik, mille edasine küpsemine on 60S subühiku küpsemisest sõltumatu. Ülejäänud rRNA assambleerub LSU ribosomaalsete valkude ja biogeneesifaktoritega ning sellest moodustub 60S subühik. Ribosoomi väikese subühiku protsessimiseks A₀, A₁ ja A₂ lõikesaitidest on vajalik U3 snoRNA ning sellega seotud valgud (Bernstein jt, 2004; Panse ja Johnson, 2010; Fromont-Racine jt, 2003). A₂ lõikuseks on vajalik ka Bud23 valk. Bud23 metüleerib 18S rRNA-d G1575 positsioonis heeliksil, mis liitub koaksiaalselt (*coaxial stacking*) tsentraalse pseudosõlmega (White jt, 2008). Tsentraalne pseudosõlm on ribosoomi väikese subühiku RNA põhiline struktuurielement. Tsentraalse pseudosõlme korrektne voltumine on vajalik A₂ lõikuseks, mis eraldab 40S ja 60S subühiku küpsemisrajad (Hughes jt, 1996). Arvestades Bud23 metülatsioonipiirkonna ja tsentraalse pseudosõlme vahelist füüsilist interaktsiooni, võib Bud23 monitoorida väikese subühiku assambleerumist läbi oma metülatsioonisubstraadi äratundmise. Tõenäoliselt vallandab Bud23 A₂ lõikuse ainult oma substraadi korrektse voltumisel, mis võib sõltuda tsentraalse pseudosõlme korrektsest voltumisest. Oma substraadi

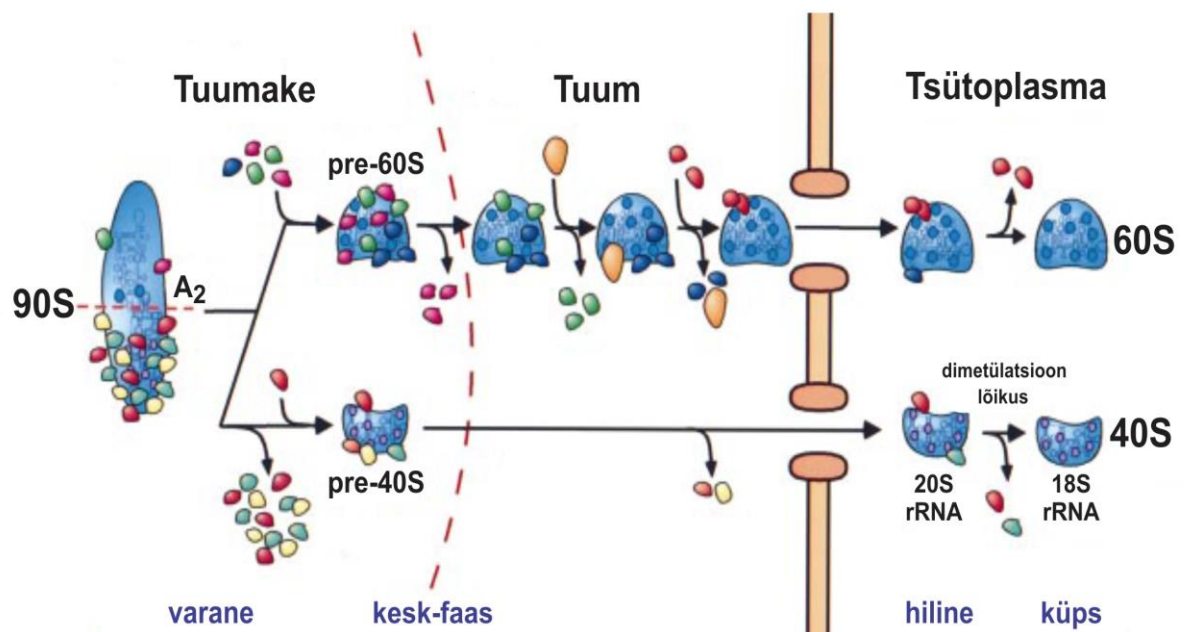
metüleerimine võib olla ainult märk, et subühik on läbinud kvaliteedikontrolli etapi ning et takistada Bud23 seondumist tagasi pre-40S partiklile (Sardana jt, 2013). U3 snoRNA aluspaardub 18S rRNA 5'-otsaga ning U3-18S dupleks takistab tsentraalse pseudosõlme moodustumist. U3 snoRNA vabanemiseks 18S rRNA-lt ning seega ka tsentraalse pseudosõlme täielikuks voltumiseks on vajalik Ecm16 valk. Ecm16 on essentsiaalne DEAH-box RNA helikaas, mis koos Bud23-ga on vajalikud A₂ lõikuseks. Bud23 liitumine pre-rRNA-ga viib ilmselt SSU protsessoomi eraldumiseni tõenäoliselt läbi Ecm16 stimuleerimise (Sardana jt, 2014). SSU protsessoomi eraldumine 90S preribosoomist ning pre-40S subühiku ribosomaalsete faktorite vabanemine on näha joonisel 4.



JOONIS 3. Ribosoomi väikese subühiku moodustumise lihtsustatud skeem *Saccharomyces cerevisiae* näitel. RNA polümeeras I transkribeerib tuumakeses rDNA pealt 35S rRNA, mida seejärel protsessitakse A₀, A₁ ja A₂ saitidest ning selle tulemusel moodustub 20S pre-rRNA. Minoorsel alternatiivrajal protsessitakse 35S pre-rRNA esmalt saidist A₃, mille tulemusena tekib 23S pre-rRNA, mida lõigatakse seejärel saitidest A₀, A₁ ja A₂, et moodustuks 20S prekursor (Gallagher jt, 2004). 20S rRNA eksporditakse tuumast tsütoplasmasse, kus selle endonukleolüütilisel lõikamisel saidist D tekib küps 18S rRNA, mis on 40S subühiku koostisosa. Valminud 40S subühik on seejärel valmis translatsiooni initsieerima seondades ja skanneerides translatsiooni initsiatsioonifaktorite abil mRNA-sid (Soudet jt, 2010 järgi).

40S subühiku prekursor transporditakse pärast 90S pre-ribosoomist eraldumist kiiresti läbi tuuma poori kompleksi (NPC - *nuclear pore complex*) tsütoplasmasse, kus toimub tema lõplik küpsemine. 60S subühiku prekursori 27SA rRNA küpsemine jätkub tuumas (vt joonis 4), kus

enamikul juhtudel protsessitakse teda esmalt A₃ lõikesaidist (väike osa 60S subühikuid valmivad alternatiivsel rajal) (Fromont-Racine jt, 2003). Endonukleolüütilise lõikamise eest A₃ saidist ITS1 piirkonnas vastutab essentsiaalne RMRP kompleks (Lygerou jt, 1996). RMRP saab 35S rRNA-d lõigata A₃ saidist aga ka A₁/A₂ lõikuse puudumisel (Henry jt, 1994; Torchet ja Hermann-Le Denmat, 2000). Bud23 valgu puudumisel on protsessimine A₂ lõikesaidist takistatud ning sel juhul sõltub pre-40S partikli vabanemine 90S pre-ribosoomist RMRP läbi viidud A₃ lõikusest (vt 40S partikli lõikamist alternatiivsel rajal jooniselt 3), mille järel eksporditakse see tsütoplasmasse ning protsessitakse kohe D lõikesaidist, et valmiks küps 18S rRNA (Sardana jt, 2013; Fromont-Racine jt, 2003).



JOONIS 4. Ribosomaalsete valkude osalemine ribosoomide 40S ja 60S subühiku moodustumisel. Algne 90S ribosomaalne prekursor koosneb suurest U3 protsesssoomist ja teistest 40S sünteesifaktoritest, kuid sisaldab vähe 60S preotsessimise faktoreid. Pärast protsessimist A₂ lõikesaidist moodustuvad 90S preribosoomist pre-40S ja pre-60S subühikud. Pre-60S partiklile seondub hulgaliselt ribosomaalseid faktoreid ning see läbib protsessimise, assambleerumise ja küpsemise nii tuumakeses kui tuumas (Fatica ja Tollervy, 2002; Nissan jt, 2002). Sünteesitud pre-40S subühikule seonduvad enne tsütoplasmasse liikumist veel ainult üksikud lisafaktorid (Schäfer jt, 2003 järgi).

1.6 Tuumake on funktsionaalne kompartment

Tuumake on mittemembraanne iseorganiseeruv dünaamiline kompartment, mille põhifunktsioon on ribosomaalse RNA ja ribosoomi subühikute tootmine. Tuumakese morfoloogia ja suurus on tugevalt mõjutatud rakutüübist, rakkude jagunemisest ja diferentseerumisest, tõenäoliselt seetõttu, et adapteerida ribosoomide tootmise taset vastavalt raku vajadustele. Tuumakeses eristatavad kolm peamist piirkonda: fibrillaarne tsenter, mis sisaldab inaktiivseid rDNA geene, tihe fibrillaarne komponent, kus toimub pre-rRNA süntees ja varajane protsessing, ning granulaarne komponent, kus toimub hiline protsessing ja ribosomaalsete partiklite assambleerumine. Tuumakesed formeeruvad mitoosi lõpus rDNA geenide tandeemsete korduste klastrite ümber, moodustades kompartmentid, mis lokaalselt kontsentreerivad transkriptsiooni- ja protsessingu aparate, mis on vastutavad ribosoomide subühikute biosünteesi eest. Kuigi rRNA ja ribosomaalsed valgud on eukarüootides kõrgelt konserveerunud, ei ole alati võimalik interpreteerida pärmi andmeid teistele eukarüootidele, sest näiteks erinevalt imetajatest ja taimedest, ei toimu mitoosis *Saccharomyces cerevisiae* tuumakese disassambleerumist (Cmarko jt, 2008; Raška jt, 2006; Hernandez-Verdun, 2006a; Dunder, 2012; Boisvert jt, 2007).

Tuumakese struktuuri säilimiseks on vajalik funktsionaalselt seotud ühendite seondumine, et moodustada morfoloogiliselt defineeritud tuumake kõigi kolme sellele iseloomuliku komponendiga. Selline organisatsioon on tagatud tänu pidevale ribosoomide biosünteesile. Valgud difundeeruvad vabalt läbi kogu tuuma, sealhulgas ka tuumakese, ning enamike tuumakese valkude alaliselt tuumas paiknemise aeg on keskmiselt mõnikümmend sekundit. Tuumake eksisteerib diskreetse struktuurina, kuna teatud valgud seonduvad rDNA-le, moodustades rohkem või vähem stabiilse tuumiku, mis on aluseks komplekssete tuumakese interaktsioonide ja dünaamiliste protsesside moodustumisele. Ümbritsevad nukleoplasma komponendid assotsieeruvad ja dissotsieeruvad pidevalt selle tuumakese "super-kompleksiga", kuid tuumavalkudel, mis ei leia tuumakesest interaktsioonipartnerit, on tuumas püsimise aeg kordades lühem kui tuumakese valkudel. Seega on tuumake avatud süsteem, mille komponendid on dünaamilises tasakaalus ümbritseva tuumaplasma. Tuumakese valgud ei liigu tuumakesse kindla tuumakese lokaliseerimise signaali abil, nagu on näiteks tuumalokaliseerimissignaali, vaid läbi funktsionaalsete interaktsioonide teiste makromolekulidega, mis paiknevad juba tuumakeses (Hernandez-Verdun, 2006a; Raška jt, 2006; Misteli, 2001). GTP-sõltuv mehhanism on esimene identifitseeritud viis valkude viimiseks tuumakesse (Tsai ja McKay, 2005). Samuti ei saa välistada transpordifaktorite

olemasolu, kuna on näidatud, et U3 prekursorite liikumine Cajali kehakese ja tuumakese vahel nõuab CRM1 valgu olemasolu (Boulton jt, 2004).

Lisaks ribosoomide biogeneesile on tuumakesel mitmeid teisi olulisi funktsioone, mis on seotud tuuma organisatsiooni, rakutsükli, proliferatsiooni, stressivastuse ja vananemisega. Lisaks võib tuumake osaleda ka genoomsel organisatsioonil. Ribosoomide biogenees koondab molekulaarse masinavärgi ühte kompartmenti ning see võib olla kasulik teistele funktsioonidele. Sellisel juhul võib ribosoomide biogeneesi takistamine peatada ka ülejäänud aktiivses tuumakeses toimuvad funktsioonid. Tuumakese ümberkorraldused võivad olla seotud erinevate haigustega (Dundr, 2012; Hernandez-Verdun, 2006a; Hernandez-Verdun, 2006b; Németh ja Längst, 2011; Boisvert jt, 2007), sealhulgas viirusinfektsioonidega (Hiscox, 2002; Hiscox, 2007). Mitmeid geneetilisi haigusi (näiteks Werner (Marciniak jt, 1998), Treacher Collins (Isaac jt, 2000), Bloomi (Yankiwski jt, 2000) sündroomid ja Diamond-Blackfani aneemia (Lipton ja Ellis, 2009), samuti Williams-Beuren sündroom (Sondall ja Baserga, 2014)) on seostatud geenidega, mis kodeerivad tuumakesse lokaliseeruvaid valke. Vähirakkude aktiivne proliferatsioon ühtib samuti ribosoomide biogeneesi kõrge aktiivsusega, seega võib tuumake olla potentsiaalne sihtmärk vähiteraapias (Drygin jt, 2010). Lisaks näitab mitmete tuumor-supressor valkude (p53, MDM2, p14ARF ja proto-onkogeeni valk c-Myc) lokaliseerumine tuumakesse tuumakese rolli kartsinogeneesis (Krüger ja Scheer, 2010; Lohrum jt, 2000; Rizos jt, 2000; Schlosser jt, 2003; Németh ja Längst, 2011).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Eesmärgid

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on paindlik geneetiliste manipulatsioonide suhtes, mis teeb temast lihtsasti kasutatava mudelorganismi ning see võimaldab uurida pärmis ka teiste eukarüootide geenide funktsioone. Paljude inimese geenide puhul on näidatud, et need suudavad komplementeerida pärmi teadaolevat mutatsiooni, mis näitab, et neil on sama või sarnane funktsioon, mis homoloogsel pärmi geenil (Osborn ja Miller, 2007). Inimese WBSCR22 valk komplementeerib osaliselt pärmi *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, mis näitab, et WBSCR22 ja tema homoloogi Bud23 funktsioonid on evolutsioonis vähemalt osaliselt konserveerunud. Nii WBSCR22 kui Bud23 osalevad ribosoomi 40S subühiku biogeneesis ning on olulised normaalseks rakkude kasvuks (Õunap jt, 2013; White jt, 2008).

Magistritöö eesmärgid:

I. WBSCR22 valgu lokalisatsiooni ja seda määravate determinantide iseloomustamine

1. erinevate WBSCR22 valgu deletsiooni- ja punktmutantide EGFP liitvalkude konstrueerimine
2. WBSCR22 valgu mutantide EGFP liitvalkude lokalisatsiooni analüüsimine imetajarakkudes
 - a. uurida, kas WBSCR22 valgule bioinformaatiliselt ennustatud NLS vastab funktsionaalsele NLS-ile
 - b. uurida, millised aminohapped WBSCR22 valgu C-terminaalses osas määravad WBSCR22 valgu lokalisatsiooni tuumakesse

II. analüüsida, kas WBSCR22 valgu lokalisatsioon tuumakesse on vajalik tema aktiivsuseks pärmis

1. WBSCR22 valgu deletsiooni- ja punktmutante ning WBSCR22 ja Bud23 *fusion*-valke pärmis ekspresseerivate plasmiidide konstrueerimine
2. WBSCR22 mutantide ning WBSCR22 ja Bud23 *fusion*-valkude mõju *bud23Δ* rakkude kasvule
3. WBSCR22 mutantide ning WBSCR22 ja Bud23 *fusion*-valkude mõju Bud23-defektsete rakkude ribsoomide biogeneesile

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Plasmiidid

Antud töös on kasutatud Kadri Õunapi konstrueeritud plasmide pEGFP-WBSCR22, pRS315-WBSCR22(1-264), pRS315-WBSCR22(1-207), pRS315-WBSCR22(155-281) (avaldamata), pRS315-bud23 ja pRS315-WBSCR22 (Õunap jt, 2013). Lisaks konstrueeriti töö raames plasmiidid pQM-WBSCR22-RKR, pQM-WBSCR22-KR, pEGFP-WBSCR22-17CTD, pEGFP-WBSCR22-38CTD, pEGFP-WBSCR22-NLS, pEGFP-WBSCR22(1-264), pEGFP-WBSCR22(1-207), pEGFP-WBSCR22(155-281), pEGFP-WBSCR22-RKR, pEGFP-WBSCR22-KR, pEGFP-WBSCR22-38CTD-RKR, pRS315-WBSCR22-KR, pRS315-WBSCR22-RKR, pRS315-WBSCR22-bud23 ja pRS315-bud23-WBSCR22. Kloneerimisel kasutatud praimerid on toodud välja tabelis 1.

pQM-WBSCR22-RKR ja **pQM-WBSCR22-KR** konstrueerimiseks amplifitseeriti RKR ja KR mutatsiooniga WBSCR22 järjestused pRS315-WBSCR22 plasmiidilt PCR meetodil, kasutades vastavalt ADH_S ja WB22_RKR3 või ADH_S ja WB22KR_as primereid. Mõlemad produktid lõigati XbaI restriктаasiga ning ligeeriti XbaI ja SmaI ensüümidega avatud pQM-CMV-E2-N/A (*Icosagen*) vektorisse.

pEGFP-WBSCR22-17CTD ja **pEGFP-WBSCR22-NLS** plasmiidide tegemiseks seondati omavahel vastavalt oligonukleotiidid WB_17aa_U ja WB_17aa_D või WB-NLS_U ja WB-NLS_D ning ligeeriti need HindIII ja BamHI restriктаasidega avatud pEGFP-C1 (*Clontech*) vektorisse. **pEGFP-WBSCR22-38CTD** konstrueerimiseks amplifitseeriti pQM-NTag-WB22 (Õunap jt, 2013) plasmiidilt nukleotiidne järjestus WB22_aa244 ja pCG_AS praimeritega. Saadud produkti lõigati restriктаasiga HindIII ja ligeeriti sama ensüümiga lineariseeritud pEGFP-C1 vektorisse. Vektorisse ligeeritud inserdi orientatsiooni kontrolliti PCR meetodil, kasutades primereid EGFPseq ja WB22_Bgl280.

pEGFP-WBSCR22(1-264) ja **pEGFP-WBSCR22(1-207)** konstruktide valmistamiseks amplifitseeriti WBSCR22 deletsioonimutantide järjestused vastavalt pCG-WBSCR22(1-264) ja pCG-WBSCR22(1-207) (varem nimetatud pCG-WBSCR22-del1 ja pCG-WBSCR22-del2) (Lilian Leetsi, bakalaureusetöö, 2012) plasmiididelt praimerite WB22_BglF ja pCG_AS abil. Saadud järjestusi lõigati BglII restriктаasiga ning ligeeriti BglII-ga avatud pEGFP-C1 vektorisse. Järjestuse orientatsiooni plasmiidis kontrolliti Eco52I restriктаasiga.

pCG-WBSCR22(155-281) (varem nimetatud ka pCG-WBSCR22-del5 ja pCG-WBSCR22-CTD) (Markko Salumäe, bakalaureusetöö, 2011) plasmiidilt amplifitseeriti PCR-l WBSCR22-(155-281) järjestus kasutades praimereid E2_BglF ja pCG_AS. pQM-WBSCR22-RKR ja pQM-WBSCR22-KR plasmiididelt amplifitseeriti WBSCR22-RKR ja WBSCR22-KR järjestused praimerite WB22_BglF ja pCG_AS abil. Saadudprodukte lõigati BglII ja Acc65I ensüümidega, ligeeriti samade restriктаasidega avatud pEGFP-C1 vektorisse ning saadi plasmiidid **pEGFP-WBSCR22(155-281)**, **pEGFP-WBSCR22-RKR** ja **pEGFP-WBSCR22-KR**.

pEGFP-WBSCR22-38CTD-RKR konstrueerimiseks amplifitseeriti PCR-l pEGFP-WBSCR-38CTD plasmiidilt praimerite EGFPseq ja WB22_RKR3 abil WBSCR22-38CTD-RKR järjestus, mida lõigati HindIII restriктаasiga ning ligeeriti HindIII ja SmaI-ga avatud pEGFP-C1 vektorisse.

pRS315-WBSCR22-KR ja **pRS315-WBSCR22-RKR** plasmiidide konstrueerimiseks lõigati vastavalt pQM-WBSCR22-KR ja pQM-WBSCR22-RKR vektoreid Acc65I restriктаasiga ning tehti Klenow töötlus. Seejärel lõigati antud järjestusi XbaI restriктаasiga ning ligeeriti Ecl136II ja XbaI ensüümidega avatud pRS315 (Sikorski ja Hieter, 1989) vektorisse.

pRS315-WBSCR22-bud23 valmistamiseks amplifitseeriti järjestus pQM-NTag-WB22 plasmiidilt praimeritega pCG_seq2 ja WB22_Bud23_R. Saadud produkt lõigati ensüümidega XbaI ja Eco47III ning ligeeriti vastavate ensüümidega lõigatud pRS315-bud23 plasmidi.

pRS315-bud23-WBSCR22 konstrueerimiseks amplifitseeriti huvipakkuv järjestus PCR meetodil plasmiidilt pRS315-WBSCR22, kasutades praimereid bud23-WB22_F ja LEU_R. PCR produkt ligeeriti pJET1.2/blunt (*Thermo Scientific*) vektorisse vastavalt tootjapoolsele protokollile, lõigati sealt välja Eco47III ja Eco91I restriктаasidega ning ligeeriti samade ensüümidega avatud pRS315-bud23 vektorisse.

Kloneerimised viidi läbi *Thermo Scientific* restriктаaside ja T4 ligaasiga vastavalt tootjapoolsetele protokollidele. PCR reaktsioonidel kasutati Pfu polümeraasi (*Thermo Scientific*) vastavalt tootjapoolsele protokollile. Kõik töös kasutatud plasmiidid on kontrollitud sekveneerimisel. Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α . Baktereid kasvatati LB söötmes 37°C juures. Transformeeritud bakterirakkude selektsiooniks kasutati antibiootikume ampitsilliini (100 μ g/ml) (pQM ja pRS315 baasil vektorid) või kanamütsiini (50 μ g/ml) (pEGFP vektorid) kohta. Plasmiidse DNA eraldamiseks

kasutati *Favorgen FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*-i vastavalt tootjapoolsele protokollile ning DNA kontsentratsioon määrati *NanoDrop ND-1000* spektrofotomeetriga.

TABEL 1. Kloneerimisel kasutatud praimerid

Praimer	Järjestus
ADH_S	5' TCCTCGTCATTGTTCTCG 3'
WB22_RKR3	5' TACCCCATGGTTAGAAGCGGGGCTTAGCTGCTGCGCCGGTGTACTGG 3'
WB22KR_as	5' AGAGCTCTTAGAAGGCGGGCGCGCTTG 3'
WB_17aa_U	5' AGCTGAAGTCAGACCTGACACCCAGTACACCGGCCGCAAGCGCAAGCCC CGCTTCTAA 3'
WB_17aa_D	5' GATCTTAGAAGCGGGGCTTGCGCTTGCGGCCGGTGTACTGGGTGTCAGG TCTGACTTC 3'
WB22_aa244	5' ACCCAAGCTTCAATGGTGAGGAAGAGTC 3'
pCG_AS	5' GCCAGAAGTCAGATGCTCAAG 3'
WB22_BglF	5' CAAGATCTTCTATGGCGTCCCGCGGCC 3'
WB_NLS_U	5' AGCTAGGAAGAGTCGGGCATGGGTGCTGGAGAAGAAGGAGCGGCACA GGCGCCAGTAA 3'
WB_NLS_D	5' GATCTTACTGGCGCCTGTGCCGCTCCTTCTTCTCCAGCACCCATGCCCCGAC TCTTCCT 3'
E2_BglF	5' GAAGATCTTCAATGGGTGTCTCAAGT 3'
EGFPseq	5' GACCACTACCAGCAGAACAC 3'
pCG_seq2	5' GGGACCGATCCAGCCTCC 3'
WB22_Bud23_R	5' CTGCGAGCGCTGTAATGGGAACCTCTC 3'
WB22_Bgl280	5' ATGAGATCTGAAGCGGGGCTTGCGC 3'
bud23_WB22_F	5' AGGTTCCAGCGCTTGATGTCGAGGCGGGGAATG 3'
LEU_R	5'ATGGCTTCGGCTGTGATTTC 3'

2.2.2 Eukarüootsed rakud

Töös kasutati inimese osteosarkoomi rakuliini U2OS. Rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (*Naxo*) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit ning antibiootikume penitsilliin (100 U/ml) ja streptomütsiin (100 µg/ml). Rakke inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas (*Sanyo CO₂ incubator*).

2.2.3 Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel

Plasmiidse DNA transfekkeerimiseks U2OS rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Selleks pesti koekultuuri plaatidel kasvavaid rakke PBS-ga ning eemaldati need plaadilt trüpsiini (*Naxo*) abil. Rakud kanti tsentrifuugitopsi, kuhu oli eelnevalt lisatud trüpsiiniga võrdses koguses söödet ning koguti tsentrifuugimisel 1000 rpm 5 minutit 20°C (*Eppendorf Centrifuge 5810R*). Rakud suspendeeriti värskes söötmes, mis sisaldas 5 mM BesNa puhvrit

(pH 7,5). Elektroporatsiooniküvettidesse kanti 50 µg lõhe spermi kandja-DNA-d, 1 µg plasmiidset DNA-d ning 250 µl rakususpensiooni. Transfektsioon viidi läbi *Bio-Rad GenePulser Xcell* elektroporaatoriga järgnevatel tingimustel: pinge 220 V, mahtuvus 975 µF. Pärast poratsiooni kanti rakud küvettidest 15 ml tsentrifuugituubidesse, milles oli 4 ml söödet ning tsentrifuugiti 1000 rpm 5 minutit 20°C juures. Rakud suspendeeriti 4 ml söötmes, millest 300 µl kanti 8-kannulisse koekultuuri kambrisse (*NuncTM Lab-TekTM II Chamber SlideTM System, Thermo Scientific*) ning inkubeeriti 24 tundi 5% CO₂ keskkonnas 37°C juures. EGFP liitvalkude lokaliseerimiseks kasutati Zeiss konfokaalmikroskoobi *LSM710*, kasutades 63x vesiimmersioonobjektiivi, kasutades *ZEN 2012* programmi.

2.2.4 Pärmirakud

Komplementatsioonikatsetes kasutati *Saccharomyces cerevisiae bud23Δ* (*MATa bud23::kanMX his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0*) tüve AJY2161 (White jt, 2008) ning kontrollina metsiktüüpi (WT – *wild type*) BY4741a (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0*) tüve (Brachmann jt, 1998).

pRS315 plasmiididega komplementeeritud pärm kasvatati 30°C juures -LEU söötmes (*DifcoTM* lämmastikalused 6,7 g/l, CSM -Leu 0,69 g/l (*MP Biomedicals*), glükoos 20g/l). Metsiktüüpi tüve kasvatati YPD söötmes (*DifcoTM* pärmiekstrakt 10g/l, *DifcoTM* peptoon 20g/l, glükoos 20g/l). -LEU ja YPD tasside tegemiseks lisati söötmele juurde agarit 20 g/l.

Pärmikultuuride optilist tihedust mõõdeti 600 nm juures *GE Healthcare Ultrospec 7000* spektrofotomeetriga.

2.2.5 Pärmirakkude transformatsioon

Transformatsiooniks kasutati *bud23Δ* tüve ühe koloonia rakke ning kasvatati neid ööpäev 5 ml YPD söötmes 30°C juures loksutil. Järgnevalt tehti lahjendus OD₆₀₀=0,3 50 ml YPD söötmesse ning kasvatati 30°C juures optilise tiheduseni 0,6-0,8. Pärmikultuur kanti 50 ml tsentrifuugituubi ning fuugiti 2000 rpm 1 minut (*Sigma 4K15*). Rakusadet pesti 25 ml destilleeritud veega ning tsentrifuugiti põhja 2000 rpm 1 minut. Rakusade suspendeeriti 2 ml 100mM liitiumatsetaat/ 0,5x TE puhvril ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit. Samal ajal inkubeeriti lõhe spermi DNA-d 10 minutit 100°C juures ning jahutati jääl. Tsentrifuugituubidesse segati kokku transformatsioonisegu: 100 µl rakususpensiooni, 10 µl lõhe spermi DNA-d (10 mg/ml) ja 3 µg plasmiidset DNA-d. Segule lisati 700 µl 100 mM liitiumatsetaat/ 1x TE/ 40% PEG puhvrit ning segati 30 sekundit *vortex*-il. Rakke inkubeeriti

antud segus 30 minutit 30°C juures. Seejärel lisati segusse 85 µl DMSO-t, segati ettevaatlikult ning tehti kuumašokk 15 minutit 42°C juures. Rakud koguti tsentrifuugimisel 4000 rpm 2 minutit (*Thermo MicroCL 21R*) ning resuspendeeriti 1 ml TE puhvril. Seejärel tsentrifuugiti uuesti 4000 rpm 2 minutit ning suspendeeriti rakusade 100 µl TE-s. Rakud plaaditi -LEU tassidele ning kasvatati 30°C juures 4-5 ööpäeva. Igalt transformatsiooniplaadilt kaks kolooniat külvati sektoritena uutele -LEU plaatidele, millest ühe koloonia rakke kasutati edasistes katsetes.

2.2.6 Pärmil kasvukiiruse mõõtmine

Pärmil kasvukiiruste mõõtmiseks kasvatati kultuure üleöö ning seejärel tehti lahjendused 20 ml -LEU söötmesse optilise tiheduseni OD₆₀₀ 0,1 ja mõõdeti teatud ajavahemike tagant uuesti optilist tihedust.

Pärmirakkude kasvukiiruse analüüsimiseks tehti pärmikultuuridest 10-kordsed lahjenduste read alates OD₆₀₀ 0,11 ning igast lahjendusest pipeteeriti 5 µl -LEU plaatidele. Plaadid tehti kahes korduses, millest esimesi inkubeeriti 30°C juures 3 päeva ning teisi 20°C juures 6 päeva.

2.2.7 Ultratsentrifuugimine lineaarses sahharoosi gradiendis

Pärmikultuure kasvatati 50 ml-s YPD (WT tüvi) või -LEU (pRS315 plasmiididega komplementeeritud rakud) söötmes optilise tiheduseni OD₆₀₀ 0,5-1,2. Kultuur valati 50 ml tsentrifuugituubi, lisati tsükloheksimiidi (CHX - *cycloheximide*) lõppkontsentratsioon 50 µg/ml ning tsentrifuugiti 3000 rpm 5 minutit (*Sigma 4K15*). Rakusade suspendeeriti 1 ml puhvril (10 mM Tris pH 7,5; 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml CHX), kanti üle 1,5 ml tsentrifuugituubi ning fuugiti põhja lauatsentrifuugis (*Thermo MicroCL 21R*) 4000 rpm 5 minutit. Rakud resuspendeeriti 500 µl lüüsipuhvril (10 mM Tris pH 7,5; 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂; CHX 0,1 mg/ml; 1 mM DTT), lisati 200 µl-ni keraamilised kuulikesed ja lõhuti rakud *MP Biomedicals FastPrep-24* homogeniseerijal kiirusel 4 m/s 40 sekundit. Tsentrifuugituub augustati kuumutatud nõelaga ning lüsaat koguti uude tuubi lauatsentrifuugis tsentrifuugimisel (3000 rpm 10 sekundit). Sade tsentrifuugiti põhja 13000 rpm 5 minutit, supernatant kanti uude tsentrifuugituubi ning mõõdeti RNA kontsentratsioon *NanoDrop*-iga. Linearsele 10-45% sahharoosi gradiendile (sahharoos w/V; 100 mM KCl; 20mM Tris pH 7,5; 3mM MgCl₂) kanti 6 A₂₆₀ ühikut supernatanti ning tsentrifuugiti *Beckmann Optima L-90K* ultratsentrifuugis *SW-41* rootoriga 36000 rpm 2 tundi ja 15 minutit

4°C juures. Ribosoomide profiilide visualiseerimiseks kasutati *Bio-Rad BioLogic Duo-flow* süsteemi, mis mõõtis neelduvust 254 nm juures. Näidud registreeriti isekirjutajal.

2.2.8 Bioinformaatiline analüüs

WBSCR22 valgule leiti ortoloogsed järjestused NCBI andmebaasist, kasutades *Homologene* tööriista (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/5486>), mis kasutab järjestuste võrdlemiseks blastp programmi. Saadud tulemustest valiti välja 14 mudelorganismi valgu järjestused, mis joondati MUSCLE (Edgar, 2004) programmiga MEGA5.2 (Tamura jt, 2011) pakettis, kasutades vaikimisi sätteid. Joondusel vahetati välja inimese WBSCR22 valgu pikem isovorm lühema isovormi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_059998.2) vastu, mida on uuritud enamikes töödes ning mida kasutatakse ka antud magistritöös. Joondused visualiseeriti BioEdit 7.2.3 programmiga (Hall, 1999) kasutades PAM250 maatriksit. Sarnasusprotsendid arvutati NCBI andmebaasis kasutades blastp 2.2.29 (Altschul jt, 1997) programmi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 WBSCR22 valgu lokalisatsioon imetaja rakkudes

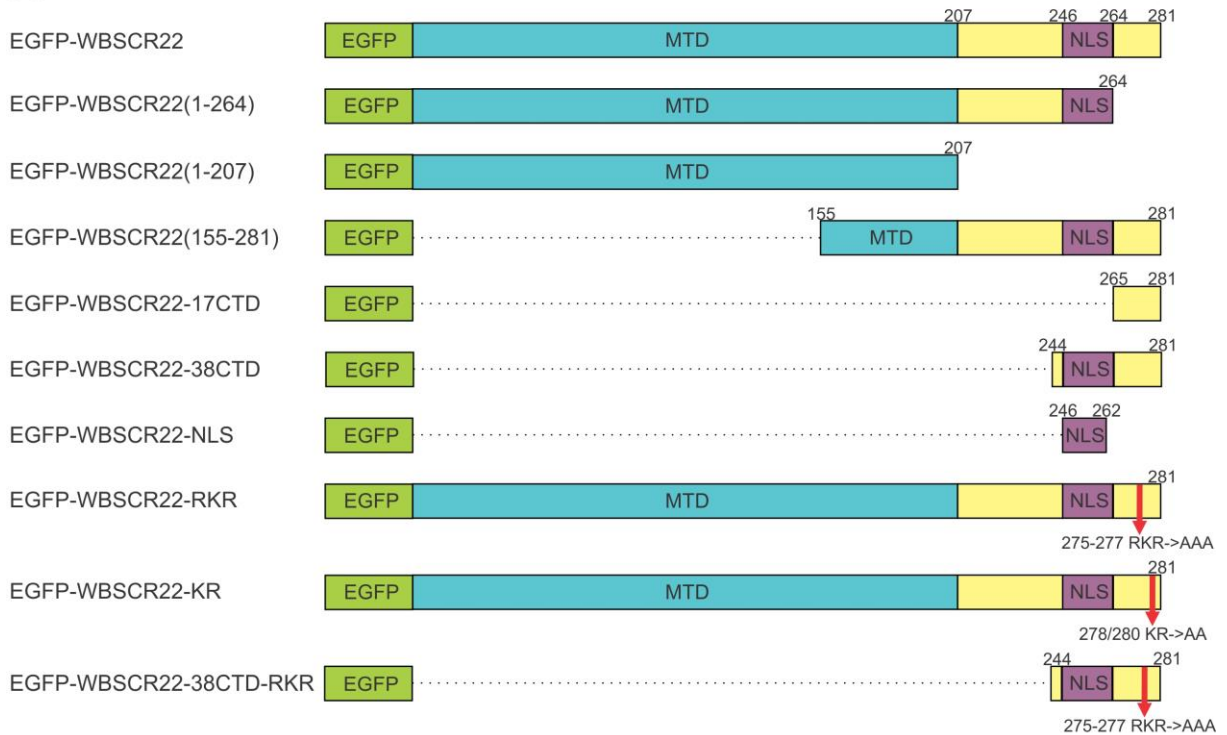
2.3.1.1 WBSCR22 valgu deletsiooni- ja punktmutantide EGFP liitvalkude ekspressiooniplasmiidide konstrueerimine

Inimese WBSCR22 valgu järjestus on evolutsiooni käigus tugevalt konserveerunud (vt lisa 1) ning vähemalt osaliselt on konserveerunud ka inimese WBSCR22 valgu ja tema kirjeldatud homoloogide, pärmi *Saccharomyces cerevisiae* Bud23 ja müürlooga *Arabidopsis thaliana* Rid2, funktsioonid. WBSCR22 valk osaleb sarnaselt oma homoloogile pärmis ribosoomi 40S subühikute biogeneesis (White jt, 2008; Sardana jt, 2013; Õunap jt, 2013). Nii Bud23, Rid2 kui WBSCR22 on vajalikud pre-rRNA protsessingul (Ohbayashi jt, 2011). Ribosoomi pre-40S subühikute assambleerumine toimub tuumakeses, kuid pärast 90S preribosoomist eraldumist transporditakse pre-40S subühikud kiiresti tsütoplasmasse ning pole seetõttu tuumaplasmas oluliselt detekteeritavad (Zemp ja Kutay, 2007; Udem ja Warner, 1973). Enamik 40S subühiku biogeneesis osalevaid valke, sealhulgas Bud23, assotsieeruvad preribosomaalsete partiklitega tuumakeses (vt joonis 4) (Schäfer jt, 2003).

WBSCR22 lokalisatsiooni ja seda määravate determinantide iseloomustamiseks oli varasemalt konstrueeritud pEGFP-WBSCR22 ekspressiooniplasmiid (Kadri Õunap, avaldamata). Antud töö raames kloneeriti vektorid WBSCR22 valgu deletsioonimutantide (pEGFP-WBSCR22(1-264), pEGFP-WBSCR22(1-207), pEGFP-WBSCR22(155-281), pEGFP-WBSCR22-17CTD, pEGFP-WBSCR22-38CTD ja pEGFP-WBSCR22-NLS) ning punktmutantide (pEGFP-WBSCR22-RKR, pEGFP-WBSCR22-KR, pEGFP-WBSCR22-38CTD-RKR) ekspresseerimiseks EGFP-liitvalguna. Vastavate EGFP liitvalkude skeemid on välja toodud joonisel 5A.

EGFP-WBSCR22(1-264) valgul on deleteeritud C-terminusest 17 aminohappe pikkune järjestus, mis sisaldab positiivselt laetud aminohappeid sisaldavat kõrgelt konserveerunud RKR-motiivi. EGFP-WBSCR22(1-207) konstruktil on lisaks deleteeritud veel *in silico* ennustatud NLS ning evolutsioonis konserveerumata järjestus metüültransferaase domeeni (MTD – *methyltransferase domain*) ja NLS-i vahel. EGFP-WBSCR22(155-281) valgul on WBSCR22 N-terminaalsest otsast deleteeritud 154 aminohappe pikkune järjestus, millega on lõhutatud MTD.

A



B

B

		280	290	300	310	
					

JOONIS 5. (A) WBSCR22 valgu ning tema deletsiooni- ja punktmutantide EGFP liitvalkude skeem. MTD – metüültransferaasne domeen (*methyltransferase domain*), NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*), CTD – karboksüterminaalne domeen (*carboxy-terminal domain*). EGFP järjestus paikneb liitvalkude N-terminuses. Täispika WBSCR22 skeemil on tähistatud MTD ja NLS paiknemine. Punktmutatsioonide paiknemised on märgitud punase noolega. **(B)** WBSCR22 valgu homoloogide C-terminaalse osa konserveerumine. Joondusel alates 310 positsioonist paiknevad tugevalt konserveerunud aminohapped R275, K276, R277 on WBSCR22-RKR mutandil, ning sellele järgnevad K278 ja R280 WBSCR22-KR mutandil muudetudalaniinideks. *H. sapiens* (inimene), *P. troglodytes* (šimpans), *M. mulatta* (reesusmakaak), *B. taurus* (koduveis), *M. musculus* (koduhiir), *R. norvegicus* (rändrott), *G. gallus* (kodukana), *D. rerio* (sebrakala), *D. melanogaster* (äädikakärbes), *C. elegans* (ümaruss), *S. cerevisiae* (pagaripärm), *A. thaliana* (müürloog), *O. sativa* (riis) ja *X. tropicalis* (kannuskonn). Mustalt on varjutatud piirkonnad, mis on 90% ulatuses konserveerunud, halliga varjutatud piirkonnad sisaldavad 90% järjestustel sarnaseid aminohappeid. (Kogu järjestuse joondus on toodud välja lisas 1.)

Eraldi on liidetud EGFP-le ka lühikesed WBSCR22 valgu C-terminaalsed järjestused. EGFP-WBSCR22-17CTD puhul on EGFP-ga liidetud WBSCR22 valgu 17 aminohappe pikkune karboksü- ehk C-terminaalne domeen (CTD – *carboxy-terminal domain*), mis on deleteeritud EGFP-WBSCR22(1-264) puhul ja mis sisaldab positiivselt laetud RKR-motiivi. EGFP-WBSCR22-38CTD korral on EGFP fuseeritud WBSCR22 38 aminohappe pikkuse CTD-ga, mis sisaldab nii positiivselt laetud RKR motiivi kui bioinformaatiliselt ennustatud NLS-i. Lisaks on veel kloneeritud EGFP-WBSCR22-NLS konstrukt, millelt ekspresseeritakse EGFP liitvalguna WBSCR22 valgule *in silico* ennustatud NLS-i.

Selleks, et vaadelda, millised aminohapped WBSCR22 17CTD piirkonnas võivad olla olulised tuuma lokaliseerimiseks, konstrueeriti erinevad WBSCR22 punktmutante ekspresseerivad plasmiidid. WBSCR22 C-terminuses paiknevad positiivselt laetud aminohapped R275, K276, R277 on evolutsioonis väga tugevalt konserveerunud (vt. joonis 5B). WBSCR22 275-277 RKR järjestuse asendamiselalaniinidega saadi EGFP-WBSCR22-RKR mutant. EGFP-WBSCR22-KR mutandil on RKR-motiivile järgnevad positiivselt laetud aminohapped K278 ja R280, mis ei ole tugevalt konserveerunud, muudetudalaniinideks.

Hiljem tehti juurde ka EGFP-WBSCR22-38CTD-RKR konstrukt, mis vastab pikkuselt EGFP-WBSCR22-38CTD-le, kuid milles on sarnaselt EGFP-WBSCR22-RKR mutandile asendatud RKR-motiiv kolmealaniiniga.

2.3.1.2 WBSCR22 valgu lokaliseerimise ja seda määravate determinantide iseloomustamine

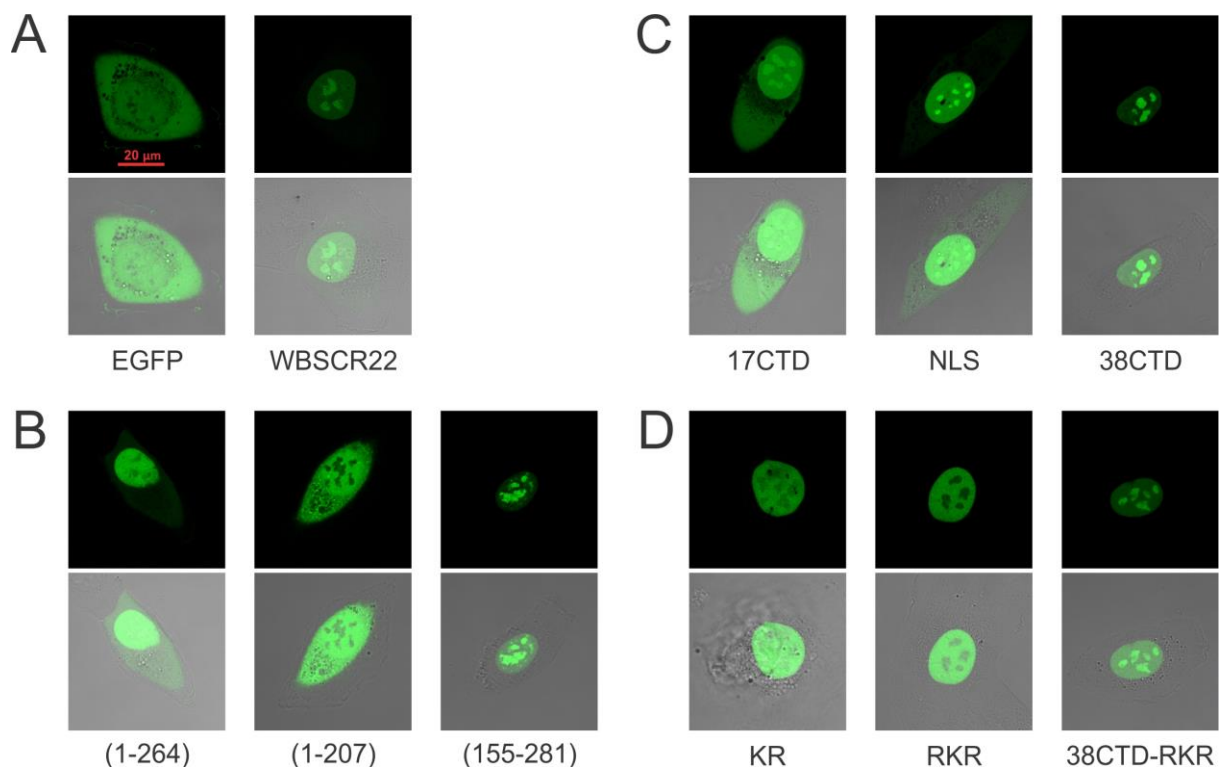
WBSCR22 valgu ning tema mutantide rakusisese lokaliseerimise määramiseks transfecteeriti U2OS rakkudesse 1 µg WBSCR22 ja tema mutantide EGFP *fusion*-valke ekspresseerivat plasmiidset DNA-d ning ekspresseeritavate EGFP liitvalkude lokaliseerimise analüüsiti konfokaalmikroskoobiga 24 h pärast transfectiooni. Kontrollina kasutati ainult EGFP-d ekspresseerivat plasmidi. WBSCR22 ja tema mutantide EGFP liitvalkude lokaliseerumine rakus on näha joonisel 6.

Joonisel 6 on näha, et EGFP-WBSCR22 liitvalk asub raku tuumas ning on toimunud akumulatsioon tuumakesse, kuigi varasemalt on immuonofluoresentsanalüüsiga näidatud, et endogeenne WBSCR22 lokaliseerub hajusalt üle raku tuuma (Nakazawa jt, 2011; Öunap jt, 2013). WBSCR22 lokaliseerimise erinevus võib tuleneda sellest, et kui valk on tuumakesega seotud, võib immuonofluoresentsanalüüsil antikeha poolt äratuntav epitoop olla varjestatud.

WBSCR22 valgu homologide Bud23 ja Rid2 puhul on näidatud antud valkude lokaliseerumist valdavalt tuumakesse (White jt, 2008; Ohbayashi, 2011). Kuna WBSCR22 osaleb sarnaselt Bud23-le ribosoomi 40S subühiku biogeneesis (White jt, 2008; Sardana jt, 2013; Õunap jt, 2013), on ilmselt WBSCR22 valgu lokaliseerumine tuumakesse spetsiifiline ja vajalik korrektseks ribosoomide biogeneesiks ning EGFP liitvalgu lokaliseerumine vastab *wild type* valgu lokaliseerumisele rakus. WBSCR22 valgu erinev lokaliseerumine elusrakus EGFP liitvalguna ning fikseeritud rakkude puhul võib tuleneda EGFP-WBSCR22 valgu üleekspressioonist, mille tulemusel toimub valgu akumulatsioon tuumakesse. Füsioloogilistel tingimustel ehk madalama ekspressioonitaseme korral võib WBSCR22 paikneda rohkem hajusalt üle tuuma. WBSCR22 valgu täpne funktsioon 40S subühikut biogeneesis ei ole teada. WBSCR22 valk ei pruugi seonduda stabiilselt ribosomaalsete partikkelitega ning seega ei pruugi füsioloogilistel tingimustel toimuda ka tema akumulatsiooni tuumakesse, vaid võib toimuda pidev liikumine tuuma ja tuumakese vahel. WBSCR22 valk võib liikuda tuumakesse ainult oma funktsiooni täitmise ajaks, seejärel dissotseeruda oma substraadilt ja relokaliseeruda tagasi tuumaplasmasse.

WBSCR22 valgu deletsioonimutandid lokaliseerusid rakus täispikast WBSCR22 valgust erinevalt (vt joonis 6B). EGFP-WBSCR22(1-264) valk (joonisel 6B märgitud (1-264)), millel puudus C-terminusest 17 aminohapet, paiknes üle tuuma, kuid tuumakestes oli teda vähem. See näitab, et WBSCR22 valgu 17CTD domeen on vajalik valgu seondumiseks tuumakese struktuuridele. Varasemalt on näidatud, et kui täispikk WBSCR22 valk kosedimenteerub lineaarses sahharoosi gradiendis koos ribosoomi 40S või pre-40S subühikutega (Õunap jt, 2013), siis WBSCR22(1-264) seondumine ribosoomi 40S või pre-40S subühikutega toimub vaid vähesel määral (Lilian Leetsi, bakalaureusetöö, 2012). Järelikult on WBSCR22 valgu 17CTD vajalik WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuumakesse ning seeläbi tema seondumiseks ribosoomi pre-40S subühikuga või WBSCR22 interakteerumiseks mõne ribosomaalse valguga.

EGFP-WBSCR22(1-207) valk (joonisel 6B märgitud (1-207)), millel oli C-terminusest deleteeritud 17CTD ning lisaks bioinformaatsiliselt ennustatud NLS, lokaliseerus sarnaselt EGFP-le ning paiknes üle kogu raku, kuid mitte tuumakestes, mis näitab, et WBSCR22 valgu C-terminaalne osa on vajalik WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuuma ja seondumiseks tuumakese struktuuridele. Ilmselt C-terminuse puudumise tõttu ei toimu enam ka WBSCR22(1-207) valgu spetsiifilist seondumist ribosoomi pre-40S subühikule (Lilian Leetsi, bakalaureusetöö, 2012).



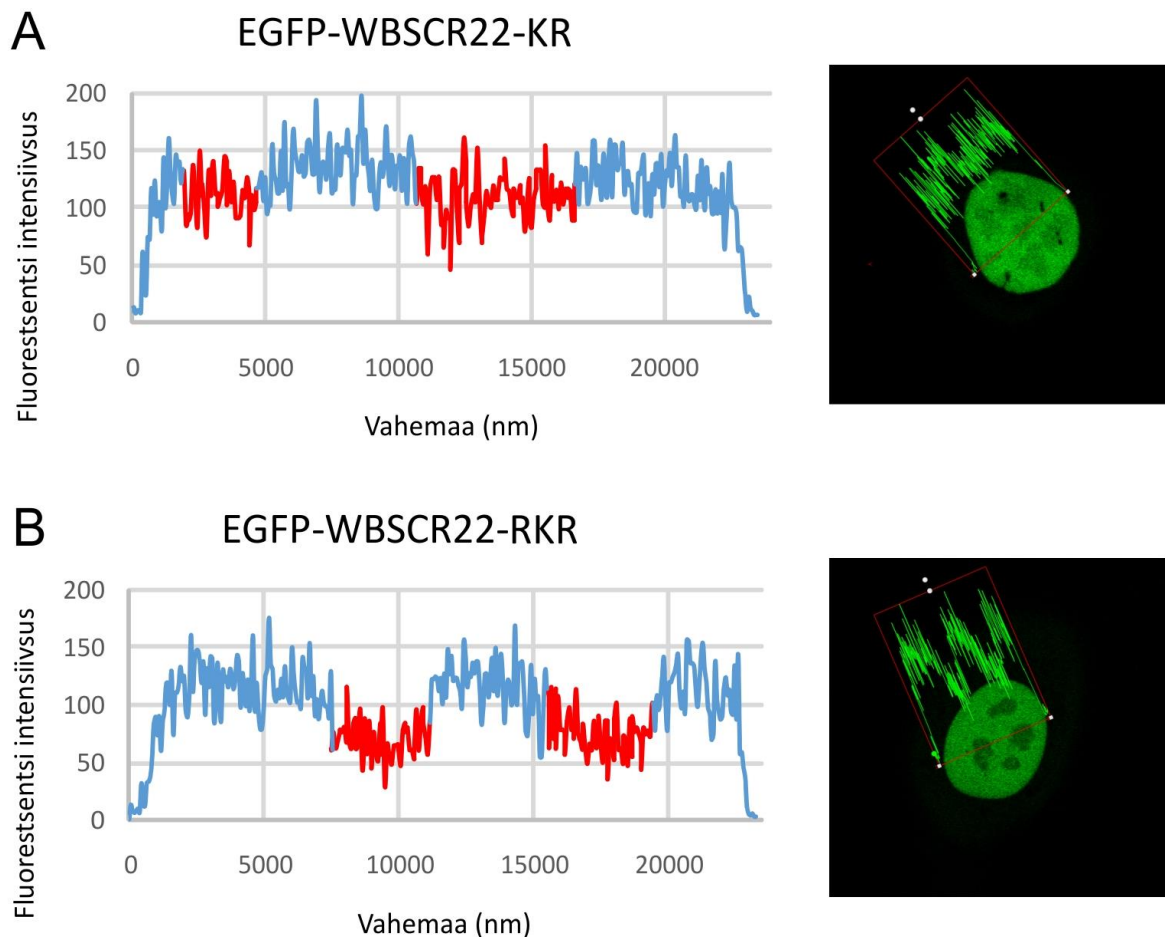
JOONIS 6. WBSCR22 valgu ja tema mutantide lokalisatsioon U2OS rakkudes. EGFP liitvalkude lokalisatsiooni elusrakkudes on uuritud konfokaalmikroskoobiga *Zeiss LSM710*, kasutades 63x suurendusega vesiiimmersioonobjektiivi. EGFP pildil on toodud välja mõõtjoon, mis vastab 20 μm -le. Võrdluseks on toodud alumises reas pildid koos läbiva valgusega. **(A)** EGFP ja EGFP-WBSCR22 (joonisel WBSCR22). **(B)** WBSCR22 deletsioonimutandid EGFP-WBSCR22(1-264), EGFP-WBSCR22(1-207) ja EGFP-WBSCR22(155-281) (joonisel vastavalt (1-264), (1-207) ja (155-281)). **(C)** WBSCR22 deletsioonimutandid EGFP-WBSCR22-17CTD, EGFP-WBSCR22-NLS ja EGFP-WBSCR22-38CTD (joonisel vastavalt 17CTD, NLS ja 38CTD). **(D)** WBSCR22 punktmutandid EGFP-WBSCR22-KR, EGFP-WBSCR22-RKR, EGFP-WBSCR22-38CTD-RKR (joonisel vastavalt KR, RKR ja 38CTD-RKR).

EGFP-WBSCR22(155-281) valk (joonisel 6B märgitud (155-281)), millel oli olemas C-terminaalne järjestus, kuid oli lõhutatud metüültransferaasne domeen valgu N-terminusest, lokaliseerus tuuma ning moodustas seal tugevamalt ekspresseeruvaid ebakorrapäraseid kogumikke, mis tõenäoliselt ei vasta tuumakese lokalisatsioonile ning on põhjustatud WBSCR22 valgu agregeerumisest, kuna valgu struktuur on lõhutatud. Varasemalt on näidatud, et WBSCR22(155-281) ei ole kompleksis kõrge molekulmassiga ühenditega (Lilian Leetsi, bakalaureusetöö, 2012). Kuigi EGFP-WBSCR22(155-281) lokaliseerub tänu C-terminaalse järjestuse olemasolule tuuma, ei paikne see tuumakeses ega ole seotud ribosomaalsete partiklitega. Seega võib WBSCR22 valgu funktsionaalsuseks, tuumakesse lokaliseerumiseks ja ribosomaalsete partiklitega seondumiseks olla vajalik valgu terviklik struktuur.

EGFP valgule liidetud WBSCR22 valgu lühikesed C-terminaalsed järjestused viisid EGFP tuuma ning seondasid selle tuumakese struktuuridele (joonis 6C). EGFP-WBSCR22-17CTD (joonisel 6C märgitud 17CTD) lokaliseerus nii tuuma kui tsütoplasmasse, kuid võrreldes EGFP-ga oli EGFP-WBSCR22-17CTD akumulunud tuumakesse. See tulemus on kooskõlas EGFP-WBSCR22(1-264) lokaliseerimisega, mis näitab, et WBSCR22 valgu 17CTD järjestus on oluline valgu lokaliseerumiseks tuumakesse. EGFP-WBSCR22-38CTD (joonisel 6C 38CTD), mis sisaldab nii WBSCR22 17CTD domeeni kui bioinformaatilist ennustatud NLS-i, lokaliseerus valdavalt tuumakesse, kuid paiknes vähesel määral ka tuumaplasmas. Seega on WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuuma ja tuumakesse vajalik 38CTD domeen. Täpsemalt vaadati ka ainult WBSCR22 bioinformaatiliselt ennustatud NLS-i võimet EGFP tuuma viia. EGFP-WBSCR22-NLS (joonisel 6C märgitud NLS) lokaliseerus tuuma ning oli tugevamalt ekspresseerunud tuumakeses. Selle järgi vastab WBSCR22 valgule bioinformaatiliselt ennustatud NLS järjestus valgu funktsionaalsele NLS-ile ning on vajalik WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuuma. NLS-i funktsionaalsust kinnitab ka WBSCR22 deletsioonimutantide WBSCR22(1-264) ja WBSCR22(155-281) rakusisene lokaliseerimine. Mõlematel mutantidel on olemas WBSCR22 valgu NLS järjestus ning vastavad valgud on lokaliseerunud tuuma. WBSCR22(1-207) mutandil NLS järjestus aga puudub ning vastav valk lokaliseerub üle raku, sealhulgas rakutuumas. Seega vaatamata NLS puudumisele saab WBSCR22(1-207) valk paikneda ka rakutuumas, kuigi kogu valku aktiivselt sinna ei transpordita. See võib tähendada, et NLS viib küll WBSCR22 valgu tuuma, kuid lisaks sellele on WBSCR22 valgul veel mõni järjestuselement, mis vastab tuuma lokaliseerimisele. Näiteks Bud23 puhul on näidatud, et deleteerides tema C-terminuse, kus paikneb ennustatud NLS, relokaliseerub Bud23 Δ C vaid kergelt ümber tsütoplasmasse, ning Bud23 lokaliseerumine peamiselt tsütoplasmasse ning mitte tuuma saavutatakse lisanduva 4 aluselise aminohappe muteerimisel MTD piirkonnast (White jt, 2008). EGFP-WBSCR22(1-207) valk võib tuuma liikuda sarnaselt EGFP-le difusiooni teel. Üldiselt arvatakse, et läbi tuuma poori difundeeruvad vabalt kuni 60 kDa suurused valgud (Nigg, 1997; Görlich, 1998). Kui WBSCR22 valgule ennustatud suurus on 31,8 kDa (Doll ja Grzeschik, 2001), siis WBSCR22(1-207) järjestus on pea kolmandiku võrra lühem täispika WBSCR22 järjestusest. Lisades sellele EGFP järjestuse, mille suurus jääb natuke alla 30 kDa, ei ületagi EGFP-WBSCR22(1-207) liitvalk 60 kDa. Lisaks on näidatud, et läbi NPC võivad difundeeruda isegi kuni 110 kDa suurused valgud (Wang ja Brattain, 2007). Samuti võivad ainult tsütoplasmas paikneda ka väga väikesed valgud. Näiteks *Drosophila* 24 kDa suurune SCLP valk, mis on oluline lihasrakkude programmeeritud rakusurma, lokaliseerub rakus tsütoplasmasse

(Kuelzer jt, 1999). Seega pole valkude difundeerumisel läbi NPC oluline mitte ainult nende suurus, vaid ka teised biokeemilised omadused (näiteks laeng, hüdrofoobsus, interaktsioonid teiste molekulidega). Kuna WBSCR22(1-207) fenotüüp sarnaneb tugevalt ainult EGFP lokaliseerumisele rakus ehk mutantne valk on lokaliseerunud difuusselt üle kogu raku ega esine silmnähtavaid ekspressioonitasemete erinevusi tuuma ja tsütoplasma vahel, võib arvata, et WBSCR22(1-207) liigub tuuma difusiooni teel ning täispika WBSCR22 valguga tuuma viimiseks on vajalik NLS järjestus.

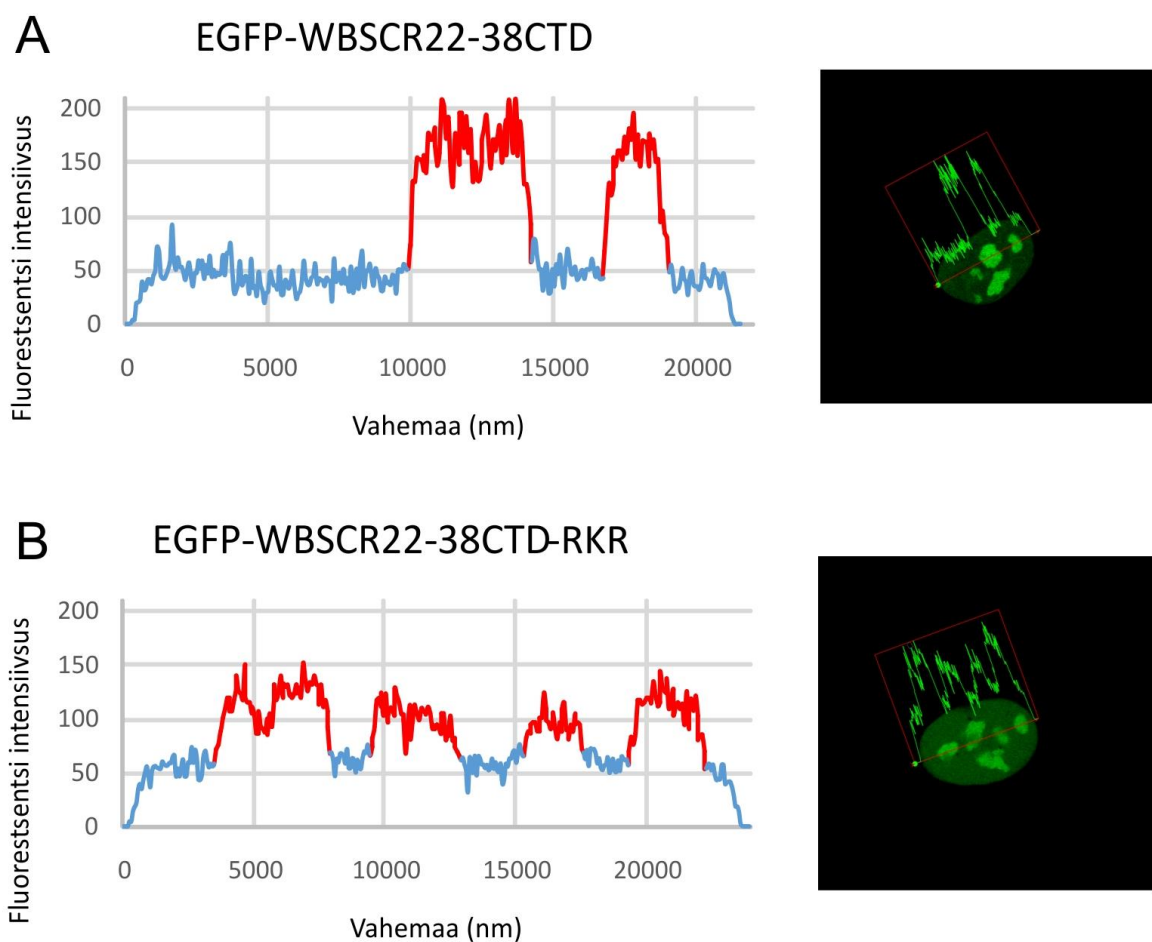
Selleks, et *in silico* valgule ennustatud NLS-i võiks pidada funktsionaalseks NLS-ks, peab see vastama neljale kriteeriumile. Esiteks peab järjestus olema essentsiaalne valguga impordiks tuuma, s.t et järjestuse deleteerimisel on lokaliseerimine tuuma oluliselt takistatud. Teiseks peab olema antud järjestus võimeline viima mingisuguse teise, antud valguga mitteseotud, valguga tuuma. Kolmandaks peab antud järjestus otseselt seonduma valguga oletatava impordireseptoriga. Ning neljandaks, selleks et kindlaks määrata, millise impordimehhanismi abil valk tuuma viiakse, peab antud mehhanismi häirimisel olema takistatud valguga lokaliseerimine tuuma (Lange jt, 2007). EGFP-WBSCR22(1-207) lokaliseerimisega osaliselt tsütoplasmasse ning EGFP-WBSCR22-NLS lokaliseerimisega tuuma on näidatud esimese kahe kriteeriumi olemasolu. Neljanda kriteeriumi puhul ei uurita enam otseselt NLS-i funktsionaalsust, vaid impordimehhanismi, mille uurimine imetajarakkudes on keeruline, sest spetsiifilisi tuuma impordi inhibiitoreid pole veel leitud. Selleks, et täita kolmas kriteerium ning näidata NLS järjestuse vahendatud WBSCR22 valguga seondumist oma impordimolekulile, on kõige parem viis viia läbi *in vitro* seondumiskatsed puhastatud valkudega kas RanGDP või RanGTP juuresolekul. RanGTPaas-süsteem vahendab valkude impordi läbi tuuma poori komplekside, soodustades imporditavate valkude interakteerumist nende impordivektoritega. RanGTP põhjustab impordikomplekside dissotsieerumist. Seega peaks huvipakkuv valk seondumiskatsetes RanGDP juuresolekul interakteeruma oma impordireseptoriga, kuid RanGDP juuresolekul mitte (Lange jt, 2007). Meie uurimisgrupis on WBSCR22 valgu puhastatud GST-liitvalguna bakterirakkudest. Samuti on tehtud puhastatud liitvalguga mass-spektromeetria analüüs, kus muuhulgas näidati WBSCR22 valguga interakteerumist RanGTPaasi süsteemi valguga, importiin β ning mitmete tuuma poori kompleksi valkudega (Olavi Reinsalu, bakalaureusetöö, 2012). Seega võib üsna kindlalt väita, et WBSCR22 valgule bioinformaatsiliselt ennustatud NLS järjestus vastab WBSCR22 funktsionaalsele NLS-ile, kuid selle kinnitamiseks tuleks teha veel *in vitro* seondumiskatsed RanGDP/RanGTP juuresolekul.



JOONIS 7. WBSCR22 valgu punktmutantide lokalisatsiooniprofiilid. Vasakpoolsetel graafikutel on EGFP liitvalgu fluorestsentsi suhteline intensiivsus läbi rakutuuma. Punasega on märgitud graafikul fluorestsentsi intensiivsus tuumakestes ja sinine värvus märgib fluorestsentsi intensiivsust tuumaplasmas. Parempoolsetel pildidel on märgitud graafikutel analüüsitud läbilõike asukoht. **(A)** EGFP-WBSCR22-KR fluorestsentsi intensiivsus läbi rakutuuma **(B)** EGFP-WBSCR22-RKR fluorestsentsi intensiivsus läbi rakutuuma.

Et teada saada, millised aminohapped 17CTD piirkonnas määravad WBSCR22 valgu lokalisatsiooni tuumakesse, vaadeldi WBSCR22 valgu C-terminuse punktmutantide EGFP liitvalkude rakusisest lokalisatsiooni. Jooniselt 6D on näha, et WBSCR22 punktmutandid (joonisel 6D märgitud KR ja RKR) lokaliseerusid küll tuuma, kuid mitte enam valdavalt tuumakesse nagu *wild type* WBSCR22 valk. EGFP-WBSCR22-KR lokaliseerus hajusalt üle tuuma. Graafikult 7A on näha, et EGFP-WBSCR22-KR fluorestsentsi intensiivsus on ligikaudu võrdne üle kogu tuuma ning tuumakeste piirkonnas (joonisel märgitud punasega) võib näha vaid minimaalset fluorestsentsi intensiivsuse erinevust võrreldes tuumaplasma. EGFP-WBSCR22-RKR lokaliseerub samuti tuuma, kuid võrreldes KR-mutandiga on vähenenud veelgi tema seondumine tuumakese struktuuridele. Jooniselt 7B on näha, et RKR mutandi EGFP liitvalgu fluorestsentsi intensiivsus tuumakeste piirkonnas on oluliselt

madalam, kui tuumaplasmas. Seega on tugevalt konserveerunud RKR järjestus WBSCR22 valgu C-terminuses vajalik valgu lokaliseerumiseks tuumakesse. Samuti mõjutab WBSCR22 valgu lokaliseerumist tuumakesse RKR motiivile järgnevad vähe konserveerunud aminohapped K ja R, kuid vähemal määral kui RKR järjestus. WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuumakesse on seega olulised kõik eelnevalt mainitud positiivselt laetud aminohapped valgu C-terminuses, mis võivad interakteeruda otseselt negatiivselt laetud rRNA-ga, kuid ei saa välistada ka WBSCR22 interakteerumist pre-40S ribosomaalsele partiklile mõne teise ribosomaalse valgu kaudu. Kui WBSCR22 valgule rRNA metüleerimisel (White jt, 2008), toimuks interaktsioon WBSCR22 valgu ja rRNA vahel otseselt.



JOONIS 8. WBSCR22 valgu deletsioonimutantide lokalisatsiooniprofiilid. Vasakpoolsetel graafikutel on EGFP liitvalgu fluorestsentsi suhteline intensiivsus läbi rakutuuma. Punasega on märgitud graafikul fluorestsentsi intensiivsus tuumakeses ja sinine värvus märgib fluorestsentsi intensiivsust tuumaplasmas. Parempoolsetel pildidel on märgitud noolega graafikutel analüüsitud läbilõike asukoht. **(A)** EGFP-WBSCR22-38CTD fluorestsentsi intensiivsus läbi rakutuuma **(B)** EGFP-WBSCR22-38CTD-RKR fluorestsentsi intensiivsus läbi rakutuuma.

Lisaks vaadeldi WBSCR22 topeltmutandi EGFP-WBSCR22-38CTD-RKR (joonisel 6D märgitud 38CTD-RKR) lokaliseerumist rakus. 38CTD-RKR mutant, mis mille pikkus vastab EGFP-WBSCR22-38CTD-le, kuid milles on sarnaselt EGFP-WBSCR22-RKR mutandile asendatud RKR motiiv alaniinidega, lokaliseerus rakutuumas ja tuumakestes, kuid võrreldes EGFP-WBSCR22-38CTD-ga oli lokaliseerumine tuumakestes oluliselt vähenenud. EGFP-WBSCR22-38CTD lokaliseerumise profiil on toodud joonisel 8A. Graafikult on näha, et 38CTD mutandi fluorestsentsi intensiivsus on tuumakestes kolm kuni neli korda kõrgem kui tuumaplasmas. EGFP-WBSCR22-38CTD-RKR fluorestsentsi intensiivsus tuumakeses (joonisel 8B) on aga ainult kuni kaks korda kõrgem 38CTD-RKR mutandi fluorestsentsi intensiivsusest tuumaplasmas. See näitab samuti, et tugevalt konserveerunud RKR motiiv on oluline WBSCR22 valguga lokaliseerumiseks tuumakesse.

WBSCR22 ja selle mutantide EGFP liitvalkude ekspressiooni kontrolliti ka HeLa (inimese emakakaelavähi rakud) ja COS-7 (SV40-ga transfecteeritud Aafrika rohepärdiku neerurakud) rakuliinides (tulemusi pole näidatud), kus WBSCR22 valguga ja selle mutantid lokaliseerusid sarnaselt U2OS rakkudes tehtud katsetega.

WBSCR22 valguga deletsiooni- ja punktmutantide lokaliseerumise analüüs näitas, et WBSCR22 valguga lokaliseerumise eest tuuma ja tuumakesse vastutab 38CTD domeen, mis sisaldab nii bioinformaatiliselt ennustatud NLS-i, kui tugevalt konserveerunud RKR-motiivi, mille abil WBSCR22 valguga seondub tuumakesega. Samuti on olulised tuumakesega seondumiseks RKR-motiivile järgnevad positiivselt laetud aminohapped K278 ja R280. WBSCR22 C-terminuse positiivselt laetud aminohapped võivad olla vajalikud WBSCR22 valguga seondumiseks ribosomaalsele RNA-le. WBSCR22 deletsioonimutantidega näidati, et WBSCR22 valguga C-terminuse deleteerimisel lokaliseerub WBSCR22 valguga hajusalt üle kogu raku, kuid mitte tuumakestes, ning tema aktiivset transporti tuuma ei toimu. Sellega kinnitati *in silico* ennustatud NLS järjestuse funktsionaalsust WBSCR22 valguga tuuma transportimisel. WBSCR22 valguga N-terminuse deleteerimisel paiknes WBSCR22 valguga küll tuumas, kuid moodustas agregate, seega on WBSCR22 valguga funktsionaalsuseks, tuumakesse lokaliseerumiseks ja ribosomaalsete partiklitega seondumiseks vajalik ilmselt kogu valguga terviklik struktuur.

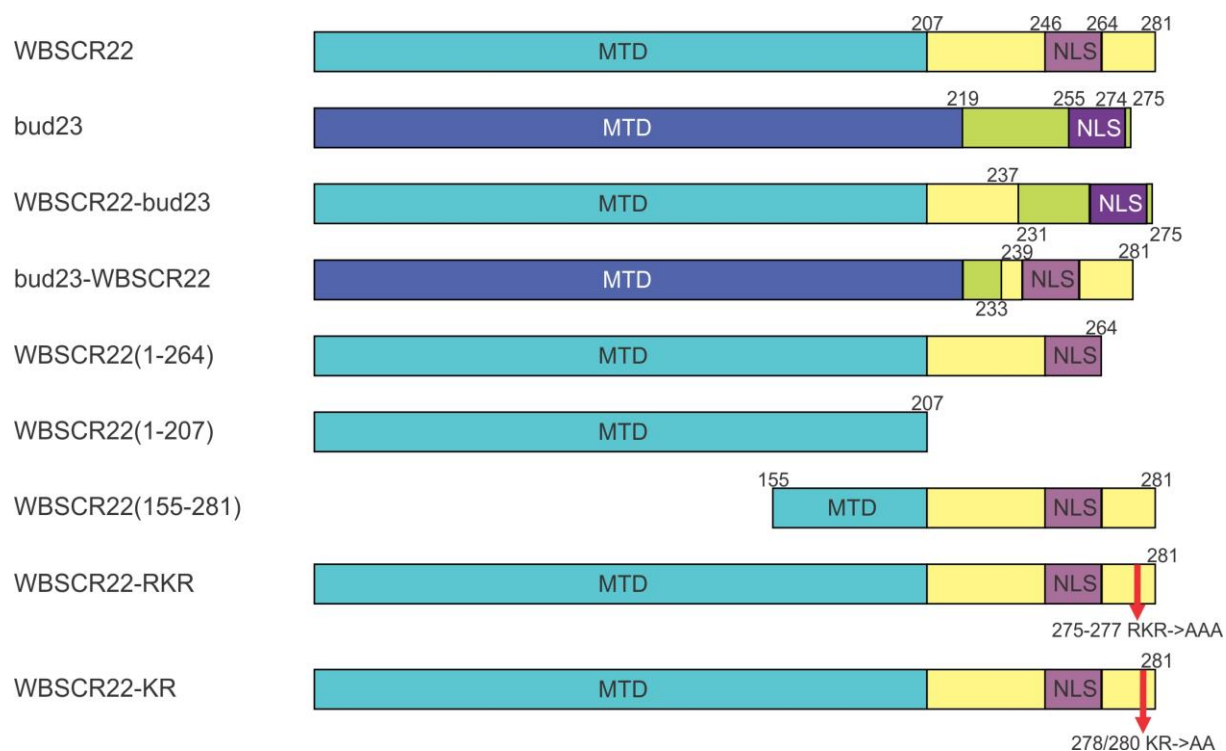
2.3.2 WBSCR22 valgu funktsionaalsus pärmis

2.3.2.1 WBSCR22 valgu mutantide pärmis kasutatavate ekspressiooniplasmiidide konstrueerimine

Metülatsiooni ainevahetusradade kompleksuse tõttu on selle uurimine hulkraksetes organismides suhteliselt keeruline. Pagaripärmil on võrreldes inimesega ligi 4 korda vähem geene, kuid ta omab siiski kõrgematele eukarüootidele omast kompleksset rakulist arhitektuuri ning on paindlik geneetiliste manipulatsioonide suhtes, mis teeb temast hästi kasutatava mudelorganismi. Kuna enamik AdoMet-sõltuvaid metüültransferaase on inimese ja pärmis vahel konserveerunud (Tehlivets jt, 2013), võimaldab see pärmirakus uurida inimese valgu funktsiooni. Selleks, et uurida WBSCR22 valgu ja tema mutantide võimet komplementeerida Bud23-deletsioonimutandi mutantset fenotüüpi, konstrueeriti plasmiidid WBSCR22 valgu, WBSCR22 valgu mutantide ning WBSCR22 ja Bud23 *fusion* valkude ekspresseerimiseks pärmis.

Antud töös on kasutatud Kadri Õunapi konstrueeritud pRS315-bud23, pRS315-WBSCR22 (Õunap jt, 2013), ja WBSCR22 deletsioonimutantide pRS315-WBSCR22(1-264), pRS315-WBSCR22(1-207) ning pRS315-WBSCR22(155-281) (avaldamata) ekspressiooniplasmiide. Antud töö raames konstrueeriti WBSCR22 punktmutantide pRS315-WBSCR22-KR, pRS315-WBSCR22-RKR, ning WBSCR22 ja Bud23 *fusion* valkude pRS315-WBSCR22-bud23 ja pRS315-bud23-WBSCR22 ekspressiooniplasmiidid. Pärmis ekspresseeritavate valkude skeem on toodud välja joonisel 9.

Varasemalt on meie töögrupis näidatud, et WBSCR22 valk komplementeerib osaliselt pärmis *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu (Õunap jt, 2013). Selleks, et uurida, kumb WBSCR22 valgu domeen on vastutav tema osalise aktiivsuse eest pärmis ja kas Bud23 C-terminus annab WBSCR22 valgule parema aktiivsuse, konstrueeriti WBSCR22-bud23 *fusion*-valk, mis koosneb WBSCR22 valgu N-terminaalsest osast (aminohapped 1-237), kus paikneb metüültransferaasne domeen, ning Bud23 C-terminaalsest osast (aminohapped 231-275), kus paikneb NLS. Hiljem konstrueeriti ka vastupidine *fusion*-valk bud23-WBSCR22, mis sisaldab Bud23 valgu N-terminust (aminohapped 1-233) ja WBSCR22 valgu C-terminaalset osa (aminohapped 233-281).



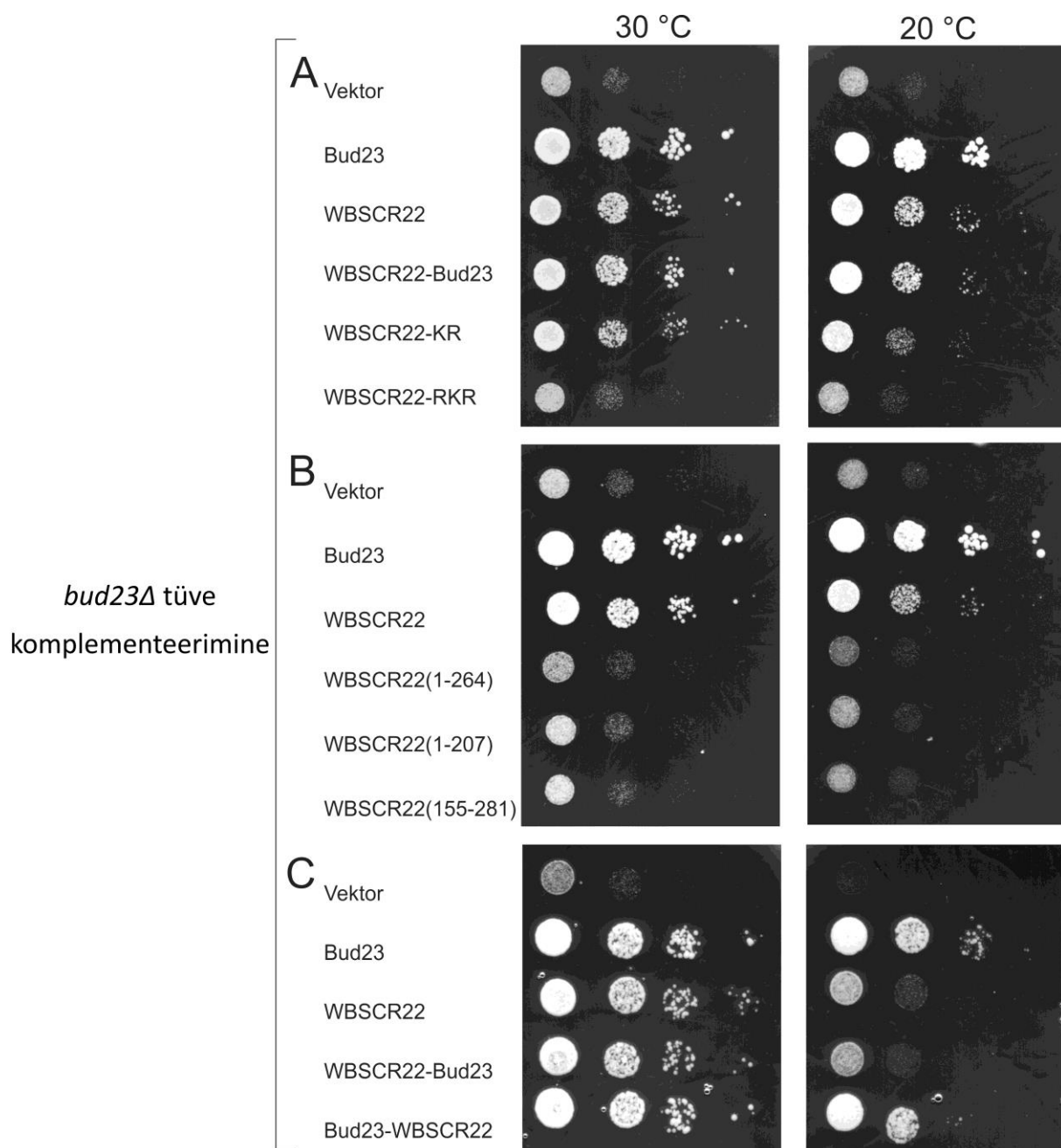
JOONIS 9. WBSCR22 ja Bud23 valgu pärmis ekspresseeritavate valkude skeemid. MTD – metüültransferaasne domeen (*methyltransferase domain*), NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*). Täispika WBSCR22 ja Bud23 skeemil on tähistatud neile ennustatud MTD ja NLS paiknemine antud valkude aminohappelisel järjestusel. Punktmutatsioonide paiknemised on märgitud punase noolega. (Bud23 valgule ennustatud NLS järjestus (aminohapped 255-274) (White jt, 2008) vastab WBSCR22 valgu aminohapetele 261-280 (vt joonisel 5B joonduse positsioonid 298-315), mis kattub WBSCR22 17CTD piirkonnaga.)

Selleks, et uurida, kas WBSCR22 valgu lokalisatsioon tuumakesse on vajalik tema aktiivsuseks pärmis, kasutati WBSCR22 valgu deletsioonimutante WBSCR22(1-264), WBSCR22(1-207) ja WBSCR22(155-281), ning punktmutante WBSCR22-KR ja WBSCR22-RKR, mis vastavad eelnevalt EGFP-le liidetud ja imetajarakus ekspresseeritud konstruktidele.

2.3.2.2 WBSCR22 valgu mõju rakkude kasvule pärmi Bud23-defektses tüves

WBSCR22 valgu mutantide ning WBSCR22 ja Bud23 liitvalkude iseloomustamiseks pärmi komplementatsioonisüsteemis analüüsiti kõigepealt vastavate konstruktidega komplementeeritud pärmi *bud23Δ* rakkude kasvu erinevatel temperatuuridel. Selleks tehti üleöö kasvanud pärmikultuuridest 10-kordsed lahjenduste read alates OD₆₀₀ 0,1 ning pipeteeriti –LEU plaatidele. 30°C juures inkubeeriti plaate 3 päeva ning 20°C juures 6 päeva. Tulemused on näha joonisel 10. Et näha paremini erinevusi erinevate konstruktidega komplementeeritud pärmi kasvukiiruste vahel, vaadeldi pärmi kasvukiirust ka vedelsöötmes

30°C juures. Selleks tehti üleöö kasvanud pärmikultuuridest lahjendus OD₆₀₀ 0,1 –LEU söötmesse ning mõõdeti teatud ajavahemike järel uuesti optilist tihedust. Pärm kasvukiiruste kõverad on toodud joonisel 11.



JOONIS 10. WBSCR22 valgu mutantidega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude kasv 30°C ja 20°C juures. Üleöö kasvatatud pärmikultuuridest tehti 10-kordsed lahjenduste read alates OD₆₀₀ 0,1 ning pipeteeriti –LEU plaadile. Plaate inkubeeriti 3 päeva 30°C juures ja 6 päeva 20°C juures.

BUD23 deletsioon põhjustab pärmirakkudel aeglast kasvu ning defekte 40S subühiku sünteesil (White jt, 2008). Jooniselt 10 on näha, et Bud23 ekspressioon 30°C juures komplementeerib *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, kuid WBSCR22 valk komplementeerib

bud23Δ mutandi kasvu ainult osaliselt. WBSCR22 valguga komplementeeritud pärmirakud kasvavad aeglasemalt, kui pärmis enda Bud23 valku ekspresseerivad rakud. Vastav kasvukiiruste erinevus on selgesti näha ka joonisel 11. Antud tulemus on vastavuses ka varem meie töögrupis tehtud komplementatsioonikatsetega (Õunap jt, 2013).

Selleks, et uurida, kumb WBSCR22 valguga domeen on vastutav tema osalise aktiivsuse eest pärmis, ja kas Bud23 C-terminus annab WBSCR22 valgule parema aktiivsuse, vaadeldi WBSCR22-*bud23* valguga komplementeeritud pärmirakkude kasvu. Jooniselt 10A on näha, et WBSCR22-*bud23* komplementeeris osaliselt *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, kuid Bud23 valguga C-terminus ei andnud talle paremat aktiivsust. Jooniselt 11 on näha, et WBSCR22-*bud23* liitvalguga komplementeeritud rakkude kasv on isegi mõnevõrra aeglasem *wild type* WBSCR22 valgu ekspresseerivatest rakkudest. Kuna Bud23 C-terminus ei andnud WBSCR22 valgule paremat aktiivsust, vaadeldi ka *bud23*-WBSCR22 liitvalgu mõju pärmis kasvule. Joonisel 10C on näha, et *bud23*-WBSCR22 valgu ekspresseerivad pärmirakud kasvavad sarnaselt *wild type* Bud23 valgu ekspresseerivate rakkudega. See näitab, et WBSCR22 valguga aktiivsuse erinevus Bud23 aktiivsusest tuleneb tema N-terminaalse osa erinevusest, kus asub metüültransferaasi domeen, Bud23 N-terminusega võrreldes. N-terminuse järjestused on WBSCR22 ja Bud23 valgul küll tugevalt konserveerunud, kuid sellegipoolest esineb erinevusi nende aminohappelises järjestuses. Kogu valguga identiteetsusprotsent WBSCR22 ja Bud23 vahel on kõigest 49% (vt lisa 1). Pärast lahknemist oma viimasest ühisest eellasest on nii inimese kui pärmis valgud evolutsioneerunud ning osaliselt võivad olla muutunud ka nende funktsioonid, samuti interaktsioonid teiste rakuliste valkude ja rRNA-ga ning interaktsioonide kokkupuutepinnad. Bud23 valguga puhul on näidatud interaktsiooni Trm112 valguga, mis on koaktivaator mitmetele AdoMet-sõltuvatele metüültransferaasidele (Figaro jt, 2012; Mazauric jt, 2010). Trm112 seondumine Bud23-le on vajalik Bud23 stabiilsuseks ning Bud23-vahendatud ribosoomi 40S subühiku biogeneesiks (Figaro jt, 2012). Meie uurimisgrupis on näidatud samuti Trm112 homoloogi TRMT112 interakteerumist WBSCR22 valguga (Maarja Matsoo, magistritöö, 2014). Sardana ja Johnson (2012) näitasid, et Trm112 ja Bud23 vaheline interaktsioon toimub läbi Bud23 R107, S110 ja D112 aminohapete, mis paiknevad MTD piirkonnas. WBSCR22 järjestusel vastavad nendele aminohapped K112, T115, D112 (vt joonduse positsioone vastavalt 117, 120, 122 lisas 1). Seega on vastavalt Trm112/TRMT112-ga seondumiseks vajalikud aminohapped Bud23 ja WBSCR22 valguga puhul juba erinevad, mis tähendab, et interaktsioonid WBSCR22 ja Trm112 valkude vahel *bud23Δ* rakkudes võivad olla nõrgemad. Trm112 valguga

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_014444.1) ja TRMT112 valgu (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_057488.1) kogu järjestuste identsus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) on aga ainult 30%. Seega võib WBSCR22 valk *bud23Δ* pärmirakkudes seonduda Trm112 valgule oluliselt väiksema afiinsusega, kui Bud23 valk, mis põhjustab WBSCR22 valgu ebastabiilsust ning võimetust täielikult kompenseerida *bud23Δ* rakkude ribosoomi 40S subühiku biogeneesi defekte. Defektne ribosoomide biogenees põhjustab aga omakorda kasvudefekte. Ribosoomi biosünteesi defektid ongi ilmselt *bud23Δ* rakkude kasvudefektide peamine põhjus, kuigi on näidatud ka Bud23 võimalikku seost septiini ringi moodustumisel pärmi pungumisel. Bud23 vajalikkus korrektse pungumismustri moodustumisel eristab teda funktsionaalselt WBSCR22 valgust ning seega ei pruugigi WBSCR22 komplementeerida Bud23 valgu kõiki teadaolevaid ja veel teadmata funktsioone.

WBSCR22 mutantidega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude kasvu vaadeldi ka 20°C juures, et analüüsida nende võimalikku külmatundlikkust. Külmatundlike mutantide kasv on pärsitud normaalsest kasvukeskkonnast madalamatel temperatuuridel. Tihti on külmatundlikkus seotud defektidega mitmest subühikust koosnevate komplekside kokkupanemisel (näiteks ribosoomide assambleerumisel). Külmatundlikku fenotüüpi põhjustavad mutatsioonid RNA-l või RNA-ga seonduvatel valkudel võivad rikkuda valk-valk interaktsioone ning põhjustada muutusi RNA funktsionaalse konformatsiooni stabiilsuses ning viia RNA valesti voltumiseni (Forsburg, 2001; Zavanelli jt, 1994).

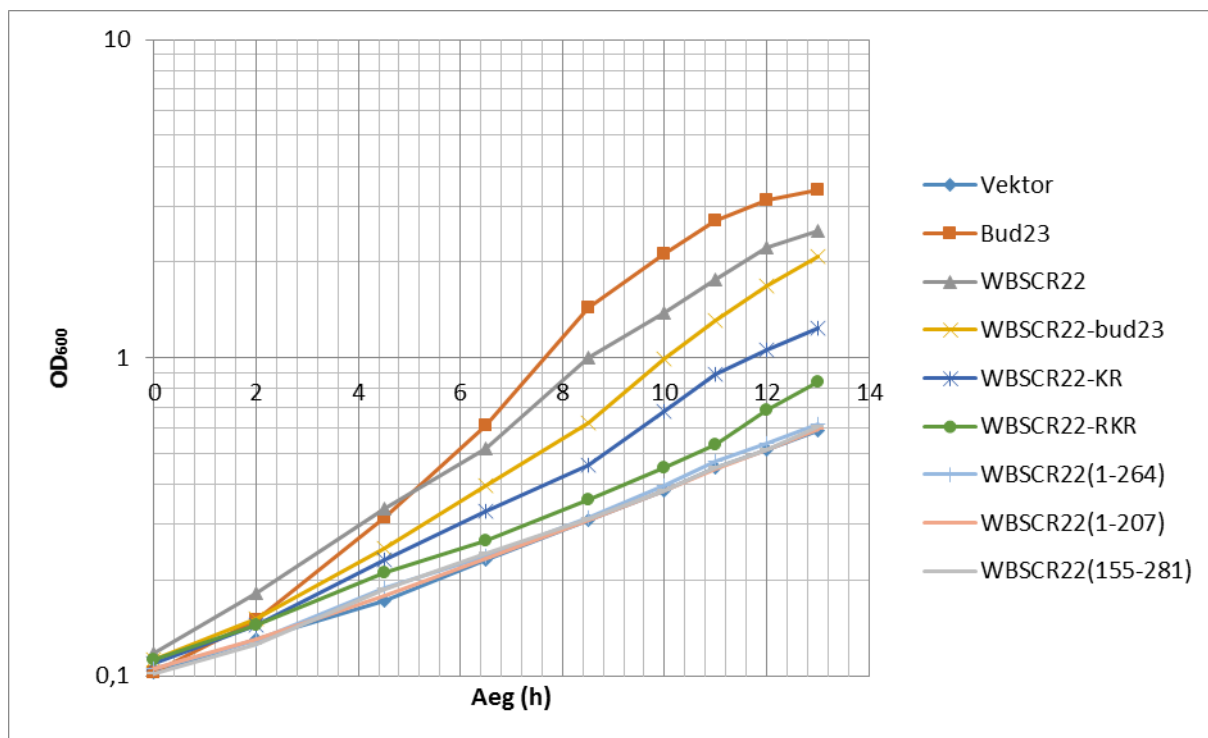
20°C juures kasvades tulevad WBSCR22 ja tema mutante ekspresseerivate rakkude kasvudefektid (joonis 10 parempoolne tulp) veel tugevamalt välja võrreldes *wild type* Bud23 valku ekspresseerivate rakkudega, mis näitab, et WBSCR22 ei suuda täielikult komplementeerida Bud23 funktsiooni. WBSCR22 ja Bud23 *fusion*-valkude puhul on näha, et WBSCR22-Bud23 valku ekspresseerivad rakud kasvavad sarnaselt *wild type* WBSCR22 valke ekspresseerivatele rakkudele, kuid oluliselt aeglasemalt kui Bud23 ja Bud23-WBSCR22 valke ekspresseerivad rakud, mis kinnitab seda, et WBSCR22 valgu aktiivsuse pärmis määrab tema N-terminaalne osa, kus paikneb metüültransferaasne domeen. Kuigi WBSCR22 puhul pole näidatud tema osalemist metüülatsoonil ega tema metüülatsoonisubstraati, on meie uurimisgrupis näidatud, et WBSCR22 valgu aktiivsuseks pärmis on oluline ka tema metüültransferaasne aktiivsus (avaldamata). Ensümaatiliste reaktsioonide toimumisel nende optimaalsest temperatuurist madalamal ja kõrgemal temperatuuril langeb ensüümide aktiivsus. Seega kui WBSCR22 valgu metüültransferaasne aktiivsus on oluline tema

aktiivsuseks pärmis, vähendab alanenud substraadi afiinsuse ja madalamatel temperatuuridel ensüümi aktiivsuse languse koosmõjul metülatsioonipuudulikkus veelgi WBSCR22 valgu võimet komplementeerida Bud23-defektsete rakkude kasvu.

WBSCR22 valgu deletsioonimutandid ei komplementeerinud *bud23Δ* kasvudefekti. Nii joonisel 10B kui jooniselt 11 on näha, et WBSCR22(1-264), WBSCR22(1-207) ja WBSCR22(155-281) konstruktidega komplementeeritud rakkude fenotüüp oli sarnane vektoriga transfekteeritud pärmirakkudele. Need tulemused erinevad aga osaliselt WBSCR22 homoloogi Bud23 deletsioonimutantidega tehtud katsetest. White jt (2008) näitasid, et Bud23ΔC, millel olid C-terminusest deleteeritud aminohapped 220-275, relokaliseerus pärmirakkudes vaid vähesel määral tsütoplasmasse ning rakkude kasv ei erinenud *wild type* Bud23 valgu ekspresseerivate rakkude kasvust. Bud23ΔC mutanti võib võrrelda WBSCR22(1-207) mutandiga, millel on samuti deleteeritud C-terminus, kuid mis lokaliseerus erinevalt Bud23ΔC valgust üle kogu raku, välja arvatud tuumakesse. Kuna WBSCR22(1-207) ning samuti WBSCR22(1-264) ei paiknenud imetajarakkudes enam tuumakeses, võib WBSCR22 valgu funktsionaalsuseks olla vajalik tema lokaliseerumine tuumakesse. Seda toetab ka White jt (2008) töös vaadeldud Bud23ΔC(K4A) mutanti ekspresseerivate rakkude fenotüüp, mille puhul näidati oluliselt vähenenud kasvu ning tuumakese lokalisatsiooni puudumist. Seega võivad Bud23 ja WBSCR22 valgu lokalisatsiooni tuumakesse määrata erinevad determinandid, kuid tuumakese lokalisatsioon on siiski oluline vastava valgu funktsionaalsuseks. White jt (2008) töös on komplementatsioonikatsed tehtud aga rikkal söötmel, mistõttu ei pruugi Bud23ΔC valgu ekspresseerivate rakkude mutantne fenotüüp avalduda ning piiratud kasvutingimustes võib ka Bud23 valgu C-terminuse deletsioon avaldada kerget mõju rakkude kasvule. Bud23 valgu N-terminuse deletsioon (aminohapped 1-219) põhjustab sarnaselt WBSCR22(155-281)-le tugeva kasvudefekti, mis on võrreldav tühja vektoriga transfekteeritud rakkude kasvuga, kuigi Bud23ΔN lokaliseerub täielikult tuuma ja tuumakesse (White jt, 2008). See näitab, et nii Bud23 kui WBSCR22 valgu aktiivsuseks pärmis on oluline metültransferaase domeeni olemasolu.

WBSCR22 valgu punktmutandid komplementeerisid Bud23-defektsete rakkude kasvu vaid vähesel määral. Jooniselt 11 on näha, et WBSCR22-KR, mis lokaliseerus imetajarakus üle tuuma, ega olnud enam akumulunud tuumakesse, komplementeeris osaliselt *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu, kuid oluliselt väiksemal määral, kui *wild type* WBSCR22 valk. WBSCR22-RKR valk, millel olid muteeritud tugevalt konserveerunud positiivselt laetud aminohapped C-terminuses, ning mis paiknes imetajarakus küll tuumas, kuid mitte enam

tuumakeses, ei komplementeerigi enam oluliselt *bud23Δ* rakkude kasvudefekti. Joonisel 11 on näha vaid minimaalselt paranenud kasv võrreldes vektori kontrolliga, mis aga joonisel 10A enam eristatav ei ole. Positiivselt laetud aminohapped WBSCR22 valgu C-terminuses on olulised tema lokaliseerumiseks rakutuumas ning seetõttu ka WBSCR22 funktsionaalsuseks. WBSCR22 deletsioonimutandi WBSCR22(1-264) mutantne fenotüüp on ilmselt peamiselt põhjustatud just nimetatud viie positiivselt laetud aminohappe puudumisest, mistõttu ei saa WBSCR22(1-264) seonduda tuumakese struktuuridele.



JOONIS 11. WBSCR22 valgu mutantidega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude kasv vedelsöötmes 30°C juures logaritmilisel skaalal. Üleöö kasvanud pärmikultuuridest tehti lahjendused OD₆₀₀ 0,1 –LEU söötmesse ning mõõdeti teatud ajavahemike järel nende optilist tihedust. Vektoriga, WBSCR22(1-264), WBSCR22(1-207) ja WBSCR22(155-281) valkudega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude kasvukõverad paiknevad ühel joonel ning pole seetõttu üksteisest eristatavad.

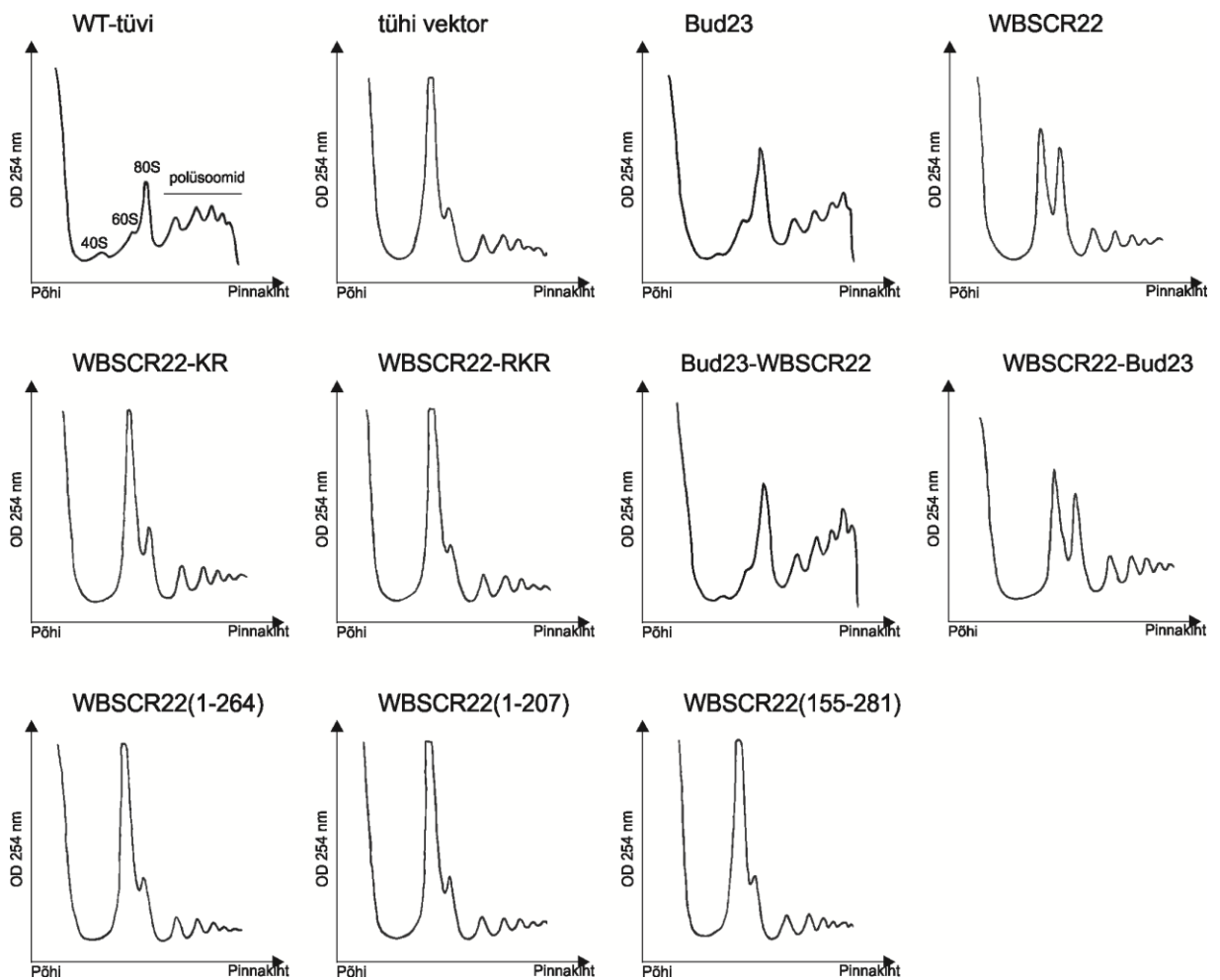
WBSCR22 valgu ja tema deletsiooni- ja punktmutantide ekspressiooni mõju analüüsimisel rakkude kasvule Bud23-defektses tüves leiti, et WBSCR22 valgu aktiivsuseks rakkude kasvu mõjutamisel on oluline tema lokaliseerimine tuuma ja tuumakesse, mille eest vastutab WBSCR22 valgu 38CTD. WBSCR22 deletsioonimutantide ekspressioon ei komplementeerinud *bud23Δ* rakkude aeglasi kasvu. WBSCR22-RKR mutandi puhul oli Bud23-defektsete rakkude kasv paranenud vaid minimaalselt ning seega ei komplementeerinud ka RKR-mutant *bud23Δ* päriliku kasvudefekti, mis näitab RKR-motiivi

olulisust WBSCR22 valgu aktiivsusel Bud23-defektsete rakkude kasvu mõjutamisel. WBSCR22-KR mutant suudab aga osaliselt komplementeerida *bud23Δ* rakkude aeglast kasvu. Seda küll oluliselt vähemal määral, kui *wild type* WBSCR22. Seega on WBSCR22 valgu aktiivsusel olulised ka aminohapped K278 ja R280, kuid nende muteerimisel suudab WBSCR22 valk osalisel aktiivsusel siiski oma funktsioone täita. WBSCR22 ja Bud23 liitvalkudega näidati, et WBSCR22 osalise aktiivsuse eest pärmirakkude kasvu mõjutamisel vastutab tema N-terminus, kus paikneb MTD. WBSCR22 C-terminuse asendamisel Bud23 C-terminusega ei paranenud WBSCR22 valgu aktiivsus *bud23Δ* rakkude kasvudefekti komplementeerimisel. Samuti näidati ka WBSCR22 külmatundlikkust *bud23Δ* pärmitüves, kus 20°C juures komplementeeris WBSCR22 valk Bud23-defektsete rakkude kasvu vaid vähesel määral, mis näitab imetaja- ja pärmisüsteemide erinevust ning rRNA ja ribosomaalsete valkude koevolutsioneerumist aja jooksul. Lisaks erinevad imetaja- ja pärmirakkudes osaliselt ka rakuliste protsesside regulatsioonimehhanismid (Conlon ja Raff, 2003).

2.3.2.3 WBSCR22 valgu mõju Bud23-defektsete rakkude ribosoomide biogeneesile

Kuna *BUD23* deletsioon põhjustab lisaks aeglase kasvu fenotüübile defekte ribosoomi 40S subühikute sünteesil (White jt, 2008), vaadeldi ka WBSCR22 valgu mutantide mõju *bud23Δ* pärmitüve ribosoomide biogeneesile. Selleks kasvatati pärmikultuure üleöö optilise tiheduseni 0,5-1,2, pärmirakud lüüsi ja 6 A₂₆₀ ühikut supernatanti kanti 10-45% lineaarsele sahharoosi gradiendile ning ultratsentrifuugiti *Beckmann SW-41* rootoriga 36000 rpm 2 tundi ja 15 minutit 4°C juures. Ribosoomide profiil visualiseeriti läbivooluspektrofotomeetri abil, mis mõõtis neelduvust 254 nm juures. Ribosoomide profiilid on toodud joonisel 12.

Bud23-defektsetel rakkudel on paigast ära ribosoomi subühikute tasakaal, vaba 40S peaaegu puudub, samas kui vabu 60S subühikuid esineb suurel hulgal, samuti on vähenenud polüsoomide hulk (White jt, 2008). Subühikute suhete muutumist *bud23Δ* mutantidel võrreldes WT-tüvega on näha ka joonisel 12 (vt WT-tüve ja vektoriga komplementeeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiile). Bud23 valgu ekspressioon *bud23Δ* rakkudes surus alla vaba 60S subühiku akumulatsioon ja parandas küpsete 80S subühikute ja polüsoomide moodustumist, WBSCR22 valgu ekspresseerimine komplementeeris *bud23Δ* pärmitüve ribosoomide biogeneesi vaid osaliselt (Õunap jt, 2013). Need erinevused on samuti jälgitavad jooniselt 12.



JOONIS 12. WBSCR22 valgu mutantidega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiilid.

Võrdluseks on toodud ka *wild type* (WT) tüve ribosoomide profiil. Rakuekstraktid lahutati ultratsentrifuugimisel 10-45% sahharoosi gradiendis. Ribosoomi vabade 40S, 60S, samuti 80S partiklite ja polüsoomide paiknemine ribosoomi profiilidel on märgitud WT-tüve graafikule. Enamus graafikutel ei ole eristatav ribosoomi 40S subühiku piik.

WBSCR22 valgu deletsioonimutandid WBSCR22(1-264), WBSCR22(1-207) ja WBSCR22(155-281) ei suutnud ükski komplementeerida *bud23Δ* rakkude kasvudefekti. WBSCR22 deletsioonimutantidega komplementeeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiil näitas samuti vektoriga transfecteeritud rakkudele sarnast fenotüüpi, mis on iseloomulik 40S subühiku biogeneesi defektile. Kuna deletsioonimutantide puhul on deleteeritud osa valgu järjestusest, võib see põhjustada valgu ebastabiilset pakkimist või valet konformatsiooni, mistõttu kaotavad need oma funktsiooni ning seetõttu ei suuda WBSCR22 valgu deletsioonimutandid komplementeerida pärmis Bud23 valgu puudumisest tulenevaid defekte rakkude kasvus ja ribosoomide biogeneesis. WBSCR22(1-264) ja WBSCR22(1-207) puhul võib olla nende suutmatuse kompenseerida Bud23 deletsioonist tulevaid ribosoomi biosünteesi

defekte põhjustatud sellest, et 17CTD järjestuse puudumise tõttu ei lokaliseeru antud mutandid tuumakesse, kuna eelnevalt oli näidatud, et WBSCR22 lokaliseatsioon tuumakesse on vajalik *bud23Δ* rakkude aeglase kasvu komplementeerimiseks. Kasvudefektid on aga põhjustatud ilmselt peamiselt just ribosoomide biogeneesi defektidest.

WBSCR22-RKR mutant, mis lokaliseerus imetajarakus tuuma, kuid mitte tuumakesse, ega suutnud komplementeerida pärmis Bud23-defektsete rakkude kasvu, ei komplementeerinud ka *bud23Δ* rakkude 40S subühiku biogeneesi defekte. Jooniselt 12 on näha, et WBSCR22-RKR valguga komplementeeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiil on sarnane vektoriga transfekteeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiilile. See näitab, et tugevalt konserveerunud RKR-motiiv on oluline WBSCR22 valgu lokaliseerumiseks tuumakesse ning tuumakese lokaliseatsioon on omakorda vajalik WBSCR22 valgu aktiivsuseks ribosoomi 40S subühiku biogeneesis. WBSCR22-KR mutant komplementeeris vähesel määral Bud23-defektsete pärmirakkude kasvu ning samuti on näha joonisel 12 WBSCR22-KR valguga komplementeeritud rakkude ribosoomide profiilil 80S subühikute hulga suurenemist võrreldes vektoriga transfekteeritud rakkude ribosoomide profiiliga. Aminohapete K278 ja R280 muteerimine ei avalda seetõttu WBSCR22 funktsioonile nii suurt mõju, kui RKR motiivi asendamine. Samas on aminohapped K278 ja R280 siiski olulised WBSCR22 valgu tuuma lokaliseerumiseks ja tema funktsionaalsuseks.

WBSCR22 ja Bud23 *fusion*-valk WBSCR22-bud23 komplementeeris osaliselt *bud23Δ* rakkude ribosoomi biogeneesi defekte. WBSCR22-bud23-ga komplementeeritud *bud23Δ* rakkude ribosoomide profiil joonisel 12 on sarnane *wild type* WBSCR22 valgu ekspresseerivate Bud23-defektsete rakkude ribosoomide profiilile, mis näitab sarnaselt eelnevale kasvukatsele, et Bud23 valgu C-terminaalne osa ei anna WBSCR22 valgule paremat aktiivsust. Samamoodi on omavahel võrreldavad Bud23 ja bud23-WBSCR22 valguga komplementeeritud rakkude ribosoomide profiilid joonisel 12. See näitab, et WBSCR22 valgu osalise aktiivsuse eest pärmirakkudes vastutab tema N-terminaalne osa, kus paikneb metüültransferaase domeen. WBSCR22 valgu metüültransferaase domeeni erinevus tuli välja ka WBSCR22(1-207) mutandi puhul, mis näitas, et WBSCR22 valgu MTD üksi ei oma aktiivsust. Imetajarakkudes lokaliseerus WBSCR22(1-207) üle kogu raku, kuid mitte tuumakestesse. Samuti ei suutnud WBSCR22(1-207) ekspressioon komplementeerida Bud23 valgu puudumisest tulenevaid defekte rakkude aeglase kasvu ning ribosoomide biogeneesi osas. Küll aga on funktsionaalne Bud23 MTD üksinda, mida näitas Bud23ΔC mutandi võime komplementeerida täielikult Bud23-defektsete rakkude kasvu. Samuti paiknes

Bud23 Δ C valk veel tuumas ning tuumakeses ja esines vaid kerge relokalisatsioon tsütoplasmasse (White jt, 2008).

WBSCR22 valgu ja tema mutantide ekspressiooni mõju uurimine *bud23 Δ* rakkude ribosoomide profiilidele näitas, et WBSCR22 valgu aktiivsuseks ribosoomi 40S subühikute biogeneesis on oluline tema lokalisatsioon tuuma ja tuumakesse ning nagu juba eelnevalt näidatud, on selleks olulised NLS ja C-terminuses paiknevad positiivselt laetud aminohapped. Positiivselt laetud RKR motiiv võib olla oluline WBSCR22 valgu otseseks seondumiseks rRNA-le või mõnele ribosomaalsele valgule. WBSCR22-RKR ning WBSCR22 deletsioonimutantide ekspressioon *bud23 Δ* rakkudes ei kompenseerinud ribosoomi 40S subühiku biogeneesi defekti. WBSCR22 valgu C-terminusest K278 ja R280 aminohapete muteerimine ei põhjustanud nii drastilist muutust WBSCR22 valgu aktiivsuses ning ribosoomide profiilil oli näha vabade 80S subühikute hulga tõus, mis tuleneb 40S subühiku biogeneesi defektide osalisest komplementatsioonist. Samuti näidati WBSCR22 ja Bud23 liitvalkudega, et WBSCR22 valgu osalise aktiivsuse eest ribosoomi 40S subühikute biogeneesis pärmis Bud23-defektses tüves vastutab WBSCR22 metüültransferaasne domeen, mis paikneb N-terminuses, ning WBSCR22 C-terminuse asendamine Bud23 C-terminusega ei anna WBSCR22 valgule paremat aktiivsust ribosoomi 40S subühikute biosünteesil pärmis.

Kokkuvõte

WBSCR22 valgule on bioinformaatiliselt ennustatud AdoMet-sõltuvat metüültransferaaset domeeni ning kaheosalist tuuma lokalisatsiooni signaali. WBSCR22 on metüültransferaas, kuid tema substraat pole veel teada. Sarnaselt Bud23-le, oma homoloogile pärmis, võib ta osaleda rRNA metüleerimisel. WBSCR22 valk komplementeerib osaliselt *bud23Δ*-defektsete rakkude aeglast kasvu, mis näitab, et WBSCR22 ja Bud23 funktsioonid on vähemalt osaliselt konserveerunud. Nii WBSCR22 kui Bud23 on vajalikud ribosoomi 40S subühiku biogeneesiks.

Antud magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada WBSCR22 valgu lokalisatsiooni ja seda määravaid determinante ning analüüsida, kas WBSCR22 valgu lokalisatsioon tuumakesse on vajalik tema aktiivsuseks pärmis. Erinevate EGFP-WBSCR22 liitvalkude abil näidati imetajarakkudes, et WBSCR22 valgu lokalisatsiooni eest tuuma ja tuumakesse vastutab 38CTD domeen, mis sisaldab nii NLS-i, kui tugevalt konserveerunud positiivseid aminohappeid sisaldavat RKR-motiivi, mille abil WBSCR22 valk seondub tuumakesega. Tuumakesega seondumiseks olid olulised ka RKR-motiivile järgnevad vähe konserveerunud aminohapped K278 ja R280. WBSCR22 valgu funktsionaalsuseks, tuumakesse lokaliseerumiseks ja ribosomaalsete partiklitega seondumiseks on ilmselt vajalik aga kogu valgu terviklik struktuur.

WBSCR22 valgu funktsionaalsuse analüüs pärmis näitas, et WBSCR22 valgu aktiivsuseks on vajalik tema lokalisatsioon tuuma ja tuumakesse, mille eest vastutab WBSCR22 C-terminus, kus paikneb NLS ja RKR-motiiv. Samuti näidati WBSCR22 ja Bud23 liitvalkudega, et WBSCR22 valgu osalise aktiivsuse eest pärmis vastutab tema N-terminus, kus paikneb metüültransferaasne domeen, ning WBSCR22 C-terminuse asendamine Bud23 valgu C-terminusega ei andnud WBSCR22 valgule paremat aktiivsust.

Activity of human WBSCR22 protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Lilian Leetsi

Summary

WBSCR22 gene is located at the 7q11.23 genomic region which is commonly deleted in patients with Williams-Beuren syndrome. WBS is a complex developmental disorder with multisystemic clinical features, which is caused by deletion of about 28 genes. The functions of most of the proteins expressed from WBS chromosomal region are not yet clear.

WBSCR22 protein contains a putative methyltransferase domain with S-adenosyl-L-methionine binding motif and a bipartite nuclear localization signal. AdoMet-dependent methyltransferases methylate a broad spectrum of cellular compounds including nucleic acids, proteins and lipids. Methylation substrate of WBSCR22 is still not known. It is shown that expression of WBSCR22 is up-regulated in cancer cells and the intact AdoMet-dependent methyltransferase domain of WBSCR22 is important in promoting metastasis formation. Furthermore, the knock-down of endogenous WBSCR22 in tumor cells reduced the viability of cancer cells and metastasis formation. WBSCR22 protein is also involved in the processing of rRNA and biogenesis of 40S ribosomal subunits. The downregulation of WBSCR22 with RNA interference causes defects in 40S subunit biosynthesis and suppresses cell growth. This suggests that WBSCR22 protein is important for normal cell growth.

The expression of WBSCR22 protein partially complements the slow growth of yeast *bud23Δ* cells showing that the function of human WBSCR22 and yeast Bud23 proteins is conserved. Bud23 protein methylates 18S rRNA and is required for efficient biogenesis of 40S ribosomal subunits.

The aim of this study was to characterize which amino acids determine the subcellular localization of WBSCR22 protein in mammalian cells and to analyze, if nucleolar localization of WBSCR22 protein is required for its activity in yeast.

Our data show that nuclear and nucleolar localization of WBSCR22 protein is determined by 38CTD domain which contains an NLS and a positively charged highly conserved RKR-motif. This motif is required for WBSCR22 to associate with nucleolus. For its interaction

with the nucleolus, the following positively charged amino acids R278 and K280 are also important.

The functional analysis of WBSCR22 protein in yeast showed that the nuclear and nucleolar localization is determined by the C-terminus containing an NLS and RKR-motif and is required for its activity in yeast. Using WBSCR22 and Bud23 fusion proteins, it is also shown that the partial activity of WBSCR22 protein is determined by its N-terminus containing a methyltransferase domain. Replacing the WBSCR22 C-terminus with the Bud23 C-terminus did not improve the activity of WBSCR22 protein.

Tänu sõnad

Täna oma juhendajaid Reet Kurge ja Kadri Õunapit suurepärase juhendamise eest. Lisaks täna Liisi Võsa, Maarja Matsood ja Aare Abroid nõu, abi ja hea seltskonna eest. Täna ka oma perekonda ja lähedasi, eriti Miriamit, kes oli mulle kõige suuremaks toeks.

Kasutatud kirjandus

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Bayés, M., Magano, L. F., Rivera, N., Flores, R., Perés Jurado, L. A. 2003. **Mutational Mechanisms of Williams-Beuren Syndrome Deletions.** *American Journal of Human Genetics* **73**: 131-151.
- Bellemer, C., Chabosseau, P., Gallardo, F., Gleizes P.-E., Stahl, G. 2010. **Genetic Interactions Show the Importance of rRNA Modification Machinery for the Role of Rps15p during Ribosome Biogenesis in *S. cerevisiae*.** *PLoS One* **5(5)**: e10472.
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E. G., Mitchell, B. M., Granneman, S., Baserga, S. J. 2004. **The Small-Subunit Processome Is a Ribosome Assembly Intermediate.** *Eukaryotic Cell* **3(6)**: 1619-1626.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A. I. 2007. **The multifunctional nucleolus.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8(7)**: 574-585.
- Boulon, S., Verheggen, C., Jady, B. E., Girard, C., Pescia, C., Paul, C., Ospina, J. K., Kiss, T., Matera, A. G., Bordonne, R., Bertrand, E. 2004. **PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli.** *Molecular Cell* **16**: 777-787.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. 1998. **Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.** *Yeast* **14(2)**: 115-132.
- Chi, L., Delgado-Olguin, P. 2013. **Expression of NOL1/NOP2/sun domain (Nsun) RNA methyltransferase family genes in early mouse embryogenesis.** *Gene Expression Patterns* **13**: 319-327.
- Cmarko, D., Smigova, J., Minichova, L., Popov, A. 2008. **Nucleolus: The ribosome factory.** *Histology and Histopathology* **23**: 1291-1298.

- Conlon, I., Raff, M. 2003. **Differences in the way a mammalian cell and yeast cells coordinate cell growth and cell-cycle progression.** *Journal of Biology* **2(1)**:7.
- Cuscó, I., Corominas, R., Bayés, M., Flores, R., Rivera-Brugués, N., Campuzano, V., Pérez-Jurado, L. A. 2008. **Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion.** *Genome Research* **18**: 683-694.
- Davierwala, A. P., Haynes, J., Li, Z., Brost, R. L., Robinson, M. D., Yu, L., Mnaimneh, S., Ding, H., Zhu, H., Chen, Y., Cheng, X., Brown, G. W., Boone, C., Andrews, B. J., Hughes, T. R. 2005. **The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes.** *Nature Genetics* **37(10)**: 1147-1152.
- Dez, C., Tollervey, D. 2004. **Ribosome synthesis meets the cell cycle.** *Current Opinion in Microbiology* **7(6)**:631-637.
- Doll, A., Grzeschik, K. H. 2001. **Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome.** *Cytogenetics and Cell Genetics* **95**: 20-27.
- Drygin, D., Rice, W. G., Grummt, I. 2010. **The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **50**: 131-156.
- Dundr, M. 2012. **Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome.** *Current Opinion in Cell Biology* **24(3)**: 415-422.
- Edgar, R. C. 2004. **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Research* **32(5)**: 1792-1797.
- Faza, M. B., Chang, Y., Occhipinti, L., Kemmler, S., Panse, V. G. 2012. **Role of Mex67-Mtr2 in the Nuclear Export of 40S Pre-Ribosomes.** *PLoS Genetics* **8(8)**: e1002915.
- Fatica, A., Tollervey, D. 2002. **Making ribosomes.** *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 313-318.
- Figaro, S., Wacheul, L., Schillewaert, S., Graille, M., Huvelle, E., Mongeard, R., Zorbas, C., Lafontaine, D. L.J., Heurgué-Hamard, V. 2012. **Trm112 is required for Bud23-mediated**

- methylation of the 18S rRNA at position G1575.** *Molecular and Cellular Biology* **32**: 2254-2267.
- Forsburg, S. L. 2001. **The art and design of genetic screens: yeast.** *Nature Reviews. Genetics* **2**: 659-668.
- Freed, E. F., Bleichert, F., Dutca, L. M., Baserga, S. J. 2010. **When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis.** *Molecular Biosystems* **6**: 481-493.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., Fasiolo, F. 2003. **Ribosome assembly in eukaryotes.** *Gene* **313**: 17-42.
- Gallagher, J., Dunbar, D., Granneman, S., Mitchell, B., Osheim, Y., Beyer, A., Baserga, S. 2004. **RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components.** *Genes and development* **18**, 2506-2517.
- Gatta, V., Tatone, C., Ciriminna, R., Vento, M., Franchi, S., d'Aurora, M., Sperduti, S., Cela, V., Borzi, P., Palermo, R., Stuppia, L., Artini, P. G. 2013. **Gene expression profiles of cumulus cells obtained from women treated with recombinant human luteinizing hormone + recombinant human follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin versus recombinant human follicle-stimulating hormone alone.** *Fertility and Sterility* **99**(7): 2000-2008.e1.
- Gu, W., Lupski, J. R. 2008. **CNV and nervous system diseases - what's new?** *Cytogenetic and Genome Research* **123**: 54-64.
- Görlich, D. 1998. **Transport into and out of the cell nucleus.** *The EMBO Journal* **17**(10): 2721-2727.
- Hall, T. A. 1999. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium* **41**: 95-98.
- Henrichsen, C. N., Csárdi, G., Zobot, M.-T., Fusco, C., Bergmann, S., Merla, G., Reymond, A. 2011. **Using Transcription Modules to Identify Expression Clusters Perturbed in Williams-Beuren Syndrome.** *PLoS Computational Biology* **7**(1): e1001054.

- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalsky, E., Kearsey, S. Tollervey, D. 1994. **The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site.** *The EMBO Journal* **13**: 2452-2463.
- Hernandez-Verdun, D. 2006a. **Nucleolus: from structure to dynamics.** *Histochemistry and Cell Biology* **125**: 127-137.
- Hernandez-Verdun, D. 2006b. **The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions.** *Histochemistry and Cell Biology* **126**: 135-148.
- Hiscox, J. A., 2002. **The nucleolus – a gateway to viral infection?** *Archives of Virology* **147**: 1077–1089.
- Hiscox, J. A., 2007. **RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus.** *Nature Reviews. Microbiology* **5**: 119–127.
- Hughes, J. M. 1996. **Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA.** *Journal of Molecular Biology* **259**: 645-654.
- Isaac, C., Marsh, K. L., Paznekas, W. A., Dixon, J., Dixon, M. J., Jabs, E. W., Meier, U. T. 2000. **Characterization of the nucleolar gene product, treacle, in Treacher Collins syndrome.** *Molecular Biology of the Cell* **11**: 3061-3071.
- Jangani, M., Poolman, T. M., Mathhews, L., Yang, N., Farrow, S.N., Berry, A., Hanley, N., Williamson, A. J. K., Whetton, A. D., Donn, R., Ray, D. W. 2014. **The Methyltransferase WBSCR22/Merm1 Enhances Glucocorticoid Receptor Function and is Regulated in Lung Inflammation and Cancer.** *The Journal of Biological Chemistry* **289(13)**: 8931-8946.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J. R., Schneper, L., Broach, J. R., Tyers, M. 2004. **A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size.** *Genes & Development* **18(20)**: 2491-2505.
- Kressler, D., Hurt, E., Bassler, J. 2010. **Driving ribosome assembly.** *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**: 673-683.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrín-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M.,

Robinson, M. D., Paccanaro, A., Bray, J. E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D. P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M. M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S. R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J. J., Gandi, K., Thompson, N. J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M. H., Butland, G., Altaf-Ul, A. M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J. S., Ingles, C. J., Hughes, T. R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S. J., Emili, A., Greenblatt, J. F. 2006. **Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Nature* **440(7084)**: 637-43.

Krüger, T., Scheer, U. 2010. **p53 localizes to intranucleolar regions distinct from the ribosome production compartments**. *Journal of Cell Science* **123**: 1203–1208.

Kuelzer, F., Kuah, P., Bishoff, S. T., Cheng, L., Nambu, J. R., Schwartz, L. M. 1999. **Cloning and analysis of small cytoplasmic leucine-rich repeat protein (SCLP), a novel, phylogenetically-conserved protein that is dramatically up-regulated during the programmed death of moth skeletal muscle**. *Journal of Neurobiology* **41(4)**: 482-494.

Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., Corbett, A. H. 2007. **Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α** . *Journal of Biological Chemistry* **282**: 5101-5105.

Leary, D. J., Huang, S. 2001. **Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus**. *FEBS Letters* **509**: 145-150.

Leetsi, Lilian. 2012. **WBSCR22 valgu ja ribosomaalse RNA assotsiatsioonid uurimine**. TÜMRI, bakalaureusetöö.

Lempiäinen, H., Shore, D. 2009. **Growth control and ribosome biogenesis**. *Current Opinion in Cell Biology* **21(6)**: 855-863.

Li, Z., Lee, I., Moradi, E., Hung, N.-J., Johnson, A. W., Marcotte, E. M. 2009. **Rational Extension of the Ribosome Biogenesis Pathway Using Network-Guided Genetics**. *PLoS Biology* **7(10)**: e1000213.

Lin, J. L., Yu, H. C., Chao, J. L., Wang, C., Cheng, M. Y. 2012. **New phenotypes generated by the G57R mutation of BUD23 in *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast* **29(12)**:537-46.

Lipton, J. M., Ellis, S. R. 2009. **Diamond Blackfan anemia 2008- 2009: broadening the scope of ribosome biogenesis disorders**. *Current Opinion in Pediatrics* **22**: 12–19.

- Lohrum, M. A., Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., Vousden, K. H. 2000. **Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2.** *Nature Cell Biology* **2**: 179-181.
- Longtine, M. S., Bi, E. 2003. **Regulation of septin organization and function in yeast.** *Trends in Cell Biology* **13(8)**: 403-409.
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., Seraphin, B. 1996. **Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro.** *Science* **272**: 268-270.
- Marciniak, R. A., Lombard, D. B., Johnson, F. B., Guarente, L. 1998. **Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6887–6892.
- Mazauric, M.-H., Dirick, L., Purushothaman, S. K., Björk, G. R., Lapeyre, B. 2010. **Trm112p Is a 15-kDa Zinc Finger Protein Essential for the Activity of Two tRNA and One Protein Methyltransferases in Yeast.** *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 18505-18515.
- Matsoo, Maarja. 2014. **Ribosoomi biogeneesi metüültransferaas WBSCR22 on rakus reguleeritud TRMT112 poolt.** TÜMRI, magistratöö.
- Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Micale, L., Fusco, C. 2010. **Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region.** *Human Genetics* **128**: 3-26.
- Merla, G., Ucla, C., Guipponi, M., Reymond, A. 2002. **Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region.** *Human Genetics* **110**: 429-438.
- Micale, L., Fusco, C., Augello, B., Napolitano, L. M. R., Dermitzakis, E. T., Meroni, G., Merla, G., Reymond, A. 2008. **Williams-Beuren syndrome TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase.** *European Journal of Human Genetics* **16**: 1038-1049.
- Misteli, T. 2001. **The concept of self-organization in cellular architecture.** *The Journal of Cell Biology* **155**: 181-185.
- Morris, C. A. 2010. **Introduction: Williams Syndrome.** *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* **154C(2)**: 203-208.

- Nakazawa, Y., Arai, H., Fujita, N. 2011. **The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis.** *Cancer Research* **71(3)**: 1146-1155.
- Narla, A., Ebert, B. L. 2010. **Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction.** *Blood* **115**: 3196-3205.
- Németh, A., Längst, G. 2011. **Genome organization in and around the nucleolus.** *Trends in Genetics* **27(4)**: 149-156.
- Ni, L., Snyder, M. 2001. **A Genomic Study of the Bipolar Bud Site Selection Pattern in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Biology of the Cell* **12**: 2147–2170.
- Niewmierzycka, A., Clarke, S. 1999. **S-Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase.** *The Journal of Biological Chemistry* **274(2)**: 814-824.
- Nigg, E. A. 1997. **Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation.** *Nature* **386(6627)**: 779-787.
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., Hurt, E. C. 2002. **60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm.** *The EMBO Journal* **21**: 5539-5547.
- Ohbayashi, I., Konishi, M., Ebine, K., Sugiyama, M. 2011. **Genetic identification of *Arabidopsis* RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing.** *The Plant Journal* **67**: 49-60.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Melief, J., Koojiman, L., Huitinga, I., Klooster, J., Bossers, K., Hol, E. M. 2014. **Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice.** *Neurobiology of aging* **35**: 1-14.
- Osborn, M. J., Miller, J. R. 2007. **Rescuing yeast mutants with human genes.** *Briefings in functional genomics and proteomics* **6(2)**: 104-111.
- Panse, V. G., Johnson, A.W. 2010. **Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality.** *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 260-266.

- Petrosian, T. C., Clarke, S. G. 2011. **Uncovering the human methyltransferasome.** *Molecular & Cellular Proteomics* **10(1)**: M110.000976.
- Phipps, K. R., Charette, J. M., Baserga, S. J. 2011. **The small subunit Processome in Ribosome Biogenesis - Progress and Prospects.** *Wiley Interdisciplinary reviews. RNA* **2(1)**: 1-21.
- Pober, B. R. 2010. **Williams-Beuren syndrome.** *The New England Journal of Medicine* **362**: 239-252.
- Raška, I., Shaw, P. J., Cmarko, D. 2006. **Structure and function of the nucleolus in the spotlight.** *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 325-334.
- Reinsalu, Olavi. 2012. **Inimese WBSCR22 valgu puhastamine ja iseloomustamine.** TÜMRI, bakalaureusetöö.
- Rizos, H., Darmanian, A. P., Mann, G. J., Kefford, R. F. 2000. **Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization.** *Oncogene* **19**: 2978–2985.
- Ruggero, D., Pandolfi, P. P. 2003. **Does the ribosome translate cancer?** *Nature Reviews. Cancer* **3(3)**: 179-192.
- Salumäe, Markko. 2011. **Williams-Beureni sündroomi kromosoomi regiooni 22 valgu lokalisatsioon rakus.** TÜMRI, bakalaureusetöö.
- Sardana, R., Johnson, A. W. 2012. **The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits.** *Molecular Biology of the Cell* **23(21)**: 4313-22.
- Sardana, R., White, J. P., Johnson, A. W. 2013. **The rRNA methyltransferase Bud23 shows functional interaction with components of the SSU processome and RNase MRP.** *RNA* **19**: 828-840.
- Sardana, R., Zhu, J., Gill, M., Johnson, A. W. 2014. **Physical and functional interaction between the methyltransferase Bud23 and the essential DEAH-box RNA helicase Ecm16.** *Molecular and Cellular Biology* **34(12)**: 2208-2220.

- Schlosser, I., Hölzel, M., Mürnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., Eick, D. 2003. **A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing.** *Nucleic Acids Research* **31**: 6148-6156.
- Schubert, C. 2008. **The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome.** *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 1178-1197.
- Schäfer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., Hurt, E. 2003. **The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes.** *The EMBO Journal* **22(6)**: 1370-1380.
- Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K.-D. 2013. **Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively.** *Nucleic Acids Research* **41(19)**: 9062-9067.
- Sikorski, R. S., Hieter, P. 1989. **A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* **122(1)**: 19-27.
- Smoot, L., Zhang, H., Klaiman, C., Schultz, R., Poer, B. 2005. **Medical overview and genetics of Williams-Beuren syndrome.** *Progress in Pediatric Cardiology* **20**: 195-205.
- Sondall, S.B., Baserga, S. J. 2014. **Human diseases of the SSU proteasome.** *Biochimica et biophysica acta* **1842**: 754-764.
- Soudet, J., Gélugne, J.-P., Belhabich-Baumas, K., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A. 2010. **Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The EMBO Journal* **29**: 80-92.
- Stefanska, B., Cheishvili, D., Suderman, M., Arakelian, A., Huang, J., Hallet, M., Han, Z.-G., Al-Mahtab, M., Akbar, S. M. F., Khan, W. A., Raqib, R., Tanvir, I., Khan, H. A., Rabbani, S. A., Szyf, M. 2014. **Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in liver cancer patients unravels novel anticancer targets.** *Clinical Cancer Research* doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0283 (avalatud veebis enne printi).
- Strunk, B. S., Karbstein, K. 2009. **Powering through ribosome assembly.** *RNA* **15**: 2083-2104.
- Zavanelli, M. I., Britton, J. S., Igel, A. H., Ares, M. Jr. 1994. **Mutations in an essential U2 small nuclear RNA structure cause cold-sensitive U2 small nuclear ribonucleoprotein**

function by favoring competing alternative U2 RNA structures. *Molecular and Cellular Biology* **14(3)**: 1689-1697.

Zemp, I., Kutay, U. 2007. **Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits.** *FEBS Letters* **581**: 2783-2793.

Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., Lupski, J. R. 2009. **Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**: 451-481.

Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., Lafontaine, D. L. J. 2013. **The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors.** *Molecular Cell* **51**: 539-551.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Molecular Biology and Evolution*. **28(10)**: 2731-2739.

Tehlivets, O., Malanovic, N., Visram, M., Pavkov-Keller, T., Keller, W. 2013. **S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: Yeast as a model system.** *Biochimica et Biophysica Acta* **1832**: 204-215.

Tiedemann, R. E., Zhu, Y. X., Schmidt, J., Shi, C. X., Sereduk, C., Yin, H., Mousses, S., Stewart, A. K. 2012. **Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNAi lethality screening of the druggable genome.** *Cancer Research* **72(3)**: 757-768.

Torchet, C., Hermann-Le Denmat, S. 2000. **Bypassing the rRNA processing endonucleolytic cleavage at site A2 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *RNA* **6**: 1498-1508.

Tsai, R. Y., McKay, R. D. 2005. **A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin.** *The Journal of Cell Biology* **168**: 179-184.

Udem, S. A., Warner, J. R. 1973. **The Cytoplasmatic maturation of a Ribosomal Precursor Ribonucleic Acid in Yeast.** *The Journal of Biological Chemistry* **248**: 1412-1416.

Wang, R., Brattain, M. G. 2007. **The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa.** *FEBS Letters* **581(17)**: 3164–3170.

White, J., Li, Z., Sardana, R., Bujnicki J. M., Marcotte, E. M., Johnson, A. W. 2008. **Bud23 Methylates G1575 of 18S rRNA and Is Required for Efficient Nuclear Export of Pre-40S Subunits.** *Molecular and Cellular Biology* **28**: 3151-3161.

Wild, T., Horvath, P., Wyler, E., Widmann, B., Badertscher, L., Zemp, I., Kozak, K., Csucs, G., Lund, E., Kutay, U. 2010. **A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export.** *PLoS Biology* **8(10)**: e1000522.

Woolford Jr, J. L., Baserga, S. J. 2013. **Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* **195**: 643-681.

Öunap, K., Käsper, L., Kurg, A., Kurg, R. 2013. **The Human WBSCR22 Protein Is Involved in the Biogenesis of the 40S Ribosomal subunits in Mammalian Cells.** *PLoS One* **8(9)**: e75686.

Yankiwski, V., Marciniak, R. A., Guarente, L., Neff, N. F. 2000. **Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5214-5219.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/5486>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_059998.2

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_014444.1

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_057488.1

Lisad

Lisa 1. WBSCR22 homoloogide joondus

	10	20	30	40	50	60	70	80	
<i>H.sapiens</i>	MASRGRRP	PHGGPPELFY	DETEARKYVRNSRMID	IQTRMAGRALELLYL	-P-ENKPCYLLDIGCGTGLSGSYLSDEG	-HY	77		
<i>P.troglodytes</i>	MASRGRRP	PHGGPPELFY	DETEARKYVRNSRMID	IQTRMAGRALELLCL	-P-ENKPCYLLDIGCGTGLSGSYLSDEG	-HY	77		
<i>M.mulatta</i>	MASRGRRP	PHGGPPELFY	DETEARKYVRNSRMID	IQTRMAGRALELLYL	-P-ENKPCYLLDIGCGTGLSGSYLSDEG	-HY	77		
<i>B.taurus</i>	MAIRGRRP	PELRGPPELFY	DKNEARKYVRNSRMID	VQIKMTGRALELLCV	-P-EDKPCYLLDIGCGTGLSGDYLSDEG	-HY	77		
<i>M.musculus</i>	MASRSRRP	PHSGPPELFY	DQNEARKYVRNSRMID	IQTKMTBRALELLCL	-P-EGQPSYLLDIGCGSGLSGDYISEEG	-HY	77		
<i>R.norvegicus</i>	MASRSRRP	PHSGPPELFY	DQNEARKYVRNSRMID	IQTKMTBRALELLCL	-P-EGQPSYLLDIGCGSGLSGDYISEEG	-HY	77		
<i>G.gallus</i>	MASSGRRP	PHRGPPELFY	DETEARKYTQNSRVAE	IQAQMARAVELLAL	-P-EGRPCLLLDVCGGSGLSGEHISEEG	-HC	77		
<i>D.rerio</i>	MSSSCRRP	EHMAPPEVFY	NEEBAKKYSNSRMIE	IQTKMTERAVELLAL	-P-EDQPCYLLDIGCGSGLSGDYISEAG	-HY	77		
<i>D.melanogaster</i>	---	MARRP	PHSAPEIFYNDDEAKKYSTNTRI	IEIQVEMABRALELLAL	-PDDDESRLILDIGCGSGLSGVLEDESE	-HM	75		
<i>C.elegans</i>	MASFVKP	PEHTGPPDLY	NETEAAKYASNSHITAI	QHEMABRALELLAL	-P-EGKSGFLLDIGCGTGMSSEVILDAC	-HM	77		
<i>S.cerevisiae</i>	---	MSRPE	ELAPPEIFYNDSEAHKYTGSTRVQHI	QAKMTLRALELLNLP	----CSFILLDIGCGSGLSGEILTQEGDHV	72			
<i>A.thaliana</i>	---	MSNRPELLAPPEIFYDDTEARKYTSSSRIVE	IQAKLSERALELLAL	-PEDGVPRFLLDIGCGSGLSGEITLSEDC	-HH	75			
<i>O.sativa</i>	---	MRP	BVQAPPEIFYNSEARKYTTSSRIIEIQSRITERALELLAL	-PNDGVPKLLLDIGCGSGLSGEITLSEDC	-HH	74			
<i>X.tropicalis</i>	MAGSVRRP	EQTGPP	ELFYNETEARKYTQNSRMIE	IQTKMTERAVELLSL	-P-EDQPCFLLDVCGGSGLSGDYISEEG	-HH	77		
	90	100	110	120	130	140	150	160	
<i>H.sapiens</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSENPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>P.troglodytes</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSENPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>M.mulatta</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSENPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>B.taurus</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSDIPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>M.musculus</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSDVPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>R.norvegicus</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSDIPAKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>G.gallus</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>D.rerio</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>D.melanogaster</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>C.elegans</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>S.cerevisiae</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>A.thaliana</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>O.sativa</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
<i>X.tropicalis</i>	WVGDISPAMLDVAVD-REIE-GDLLLLGDMGOGIPFKPCTFDGCTISISAVQWLCNANKKSHSPKRLCYFFASLFSVLVR	155							
	170	180	190	200	210	220	230	240	
<i>H.sapiens</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STFIPE-----GLS-ENQDEV	223							
<i>P.troglodytes</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STFIPE-----GLS-ENQDEV	223							
<i>M.mulatta</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STFIPE-----GLS-ENQDEV	223							
<i>B.taurus</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STSLPE-----GLS-EDTEEE	223							
<i>M.musculus</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STSLPK-----GLT-ESQDAD	223							
<i>R.norvegicus</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--P--STSLPK-----GLT-ESQDAD	223							
<i>G.gallus</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--A--SGTLPE-----GLT-ESQDAD	224							
<i>D.rerio</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFSG--V--SGVLPK-----GLDSETAVRG	224							
<i>D.melanogaster</i>	TARAVFOFYFENSDQIEMVTSQAMKAGFYGGVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--G--SGLLPQ-----ALG----SPE	218							
<i>C.elegans</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--G--VQQLPQ-----ALTEDGEESR	226							
<i>S.cerevisiae</i>	GGKEFAOFYKNDQDDVDDILQSAKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--G--VQQLPQ-----ALTEDGEESR	221							
<i>A.thaliana</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--G--VQQLPQ-----ALTEDGEESR	223							
<i>O.sativa</i>	GGRVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--G--VQQLPQ-----ALTEDGEESR	223							
<i>X.tropicalis</i>	GSRAVLQLYPENSEOLELITTOATKAGFSGGMVVDYDPSAKAKKFFYLCLFAG--V--SGVLPK-----GLGTESAEQE	224							
	250	260	270	280	290	300	310		
<i>H.sapiens</i>	EPRESVFTNE-----RFPFL-RMSRRGMVRKSRAWVLEKKERHRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	281							
<i>P.troglodytes</i>	EPRESVFTNEREGGAFERRGIQGHQTRRFPFL-RMSRRGMVRKSRAWVLEKKERHRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	298							
<i>M.mulatta</i>	EPRESVFTNE-----RVVPF-RMSRRGMVRKSRAWVLEKKERHRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	281							
<i>B.taurus</i>	KPAESTFTAD-----RIPY-RIARRGVVRKSREWVLEKKARRRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	281							
<i>M.musculus</i>	QASESMFTSE-----RAPH-KKARRDLVKKSRWVLEKKERRRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	281							
<i>R.norvegicus</i>	QASESAFTSE-----RAPH-KKARRDLVKKSRWVLEKKERRRRROGREVRPDTQYTGRRKRPRT	281							
<i>G.gallus</i>	EIQHAKFTQE-----RIRF-RNAKGKSVKKSRDWLEKKERRRRROGREVRADTKYTGRRKRPRT	282							
<i>D.rerio</i>	VVNQAQFTAQ-----RSRF-KNMKGKSAKSKDWLEKKERRRRROGREVRADTKYTGRRKRPRT	282							
<i>D.melanogaster</i>	EERRVNYIKK-----RDAC-REARGKAPKSKSRDWLEKKERRRRROGREVRADTKYTGRRKRPRT	276							
<i>C.elegans</i>	TQI--DNAGR-----RFVWNSRRKNEKVAKGSAWLEAKRQRIKQGRDVRHESKYSGRKRRTKT	283							
<i>S.cerevisiae</i>	NVNLKQLRQ-----RLKGGKDKEKSAKSFILRKELMKRRGRKVAKDSKFTGRKRRHRT	275							
<i>A.thaliana</i>	EESSEVGVSD-----RNRPR-KRQRTNTKVKGREWVLRKKEQSRKKGKNNVPADSKFTSRKRRTKT	289							
<i>O.sativa</i>	SGGDEDAQT-----VGIYERNRP-KRQRTNTKVKGREWVLRKKEQSRKKGKNNVPADSKFTSRKRRTKT	295							
<i>X.tropicalis</i>	SSRHVGFTNQ-----RMRP-KVTRGKSVKKSKDWLEKKERRRRROGREVRADTKYTGRRKRPRT	282							

Joonis L1. WBSCR22 konserveerumine eukarüootides. WBSCR22 homoloogide järjestuste joondus.

Vastavalt PAM250 maatriksile on 90% ulatuses identsed aminohapped varjatud mustalt ning sarnased

aminohapped hallilt. Joondatud on homoloogid järgmistest organismidest (sulgudes toodud välja liigi ladinakeelne nimi, valgu *Accession number* ning vastava organismi valgu järjestuse sarnasus inimese WBSCR22-le): inimene (*Homo sapiens*; NP_059998.2), šimpans (*Pan troglodytes*; XP_003318696.1; 94%), reesusmakaak (*Macaca mulatta*; XP_001115175.2; 99%), koduveis (*Bos taurus*; NP_001029629.2; 81%), koduhiir (*Mus musculus*; NP_079651.2; 80%), rändrott (*Rattus norvegicus*; NP_001129215.1; 79%), kodukana (*Gallus gallus*; NP_001034421.1; 70%), sebrakala (*Danio rerio*; NP_001076348.1; 66%), äädikakärbes (*Drosophila melanogaster*; NP_649762.1; 59%), ümaruss (*Caenorhabditis elegans*; NP_498051.1; 53%), pagaripärm (*Saccharomyces cerevisiae*; NP_009976.1; 49%), müürloog (*Arabidopsis thaliana*; NP_200538.1; 53%), riis (*Oriza sativa*; NP_001048432.1; 52%) ja kannuskonn (*Xenopus tropicalis*; NP_001011475.1; 66%).

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lilian Leetsi (sünnikuupäev: 01.08.1990),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Inimese WBSCR22 valgu aktiivsus pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*

mille juhendajad on Reet Kurg (*Ph D*) ja Kadri Õunap (*M Sc*),

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.12.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014